

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 557**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008 E 08708003 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2111547**

54 Título: **MEDIOS DE ESTABILIZACIÓN Y DE SEPARACIÓN PARA APLICACIONES DE ELECTROFORESIS**

30 Prioridad:

19.01.2007 US 885792 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.08.2013

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY
1 BECTON DRIVE
FRANKLIN LAKES, NJ 07417-1180, US**

72 Inventor/es:

WEBER, GERHARD

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 420 557 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios de estabilización y de separación para aplicaciones de electroforesis

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a la electroforesis de flujo libre (*Free Flow Electrophoresis*, FFE) que se emplea para la separación de analitos tales como biopartículas en una muestra. Más específicamente, la presente invención descrita en la presente memoria se refiere a medios de separación así como a medios de estabilización usados para

10 llevar a cabo electroforesis de flujo libre.

Antecedentes de la invención

15 [0002] La electroforesis es una tecnología bien establecida para la separación de partículas basada en la migración de partículas cargadas bajo la influencia de una corriente eléctrica continua. Se han desarrollado varios modos de operación diferentes tales como isoelectroenfoque (*IsoElectric Focusing*, IEF), isotacoforesis (*IsoTachoPhoresis*, ITP), y electroforesis de zona (*Zone Electrophoresis*, ZE) como variantes el principio de separación anterior y se conocen generalmente por los expertos en la materia.

20 [0003] La electroforesis por isoelectroenfoque (IEF) es una técnica empleada habitualmente, por ejemplo, en la caracterización de proteínas como mecanismo para determinar el punto isoeléctrico de la proteína (véase, por ejemplo, *Analytical Biochemistry*. Addison Wesley Longman Tercera Edición Limitada, 1998).

25 [0004] La isotacoforesis es una tecnología basada en un principio descrito en 1920. En esta técnica el electrolito entre los electrodos no es una única solución uniforme sino una secuencia discontinua de diferentes soluciones de electrolitos, los iones de las cuales migran todos a la misma velocidad. En condiciones idénticas de concentración y tensión, los iones diferentes tienen movilidades electroforéticas diferentes. Para causar que todos los iones se muevan a la misma velocidad se requiere un gradiente de tensión diferente para cada grupo de iones. El gradiente diferente se desarrolla espontáneamente durante el procedimiento de electroforesis. En la práctica, esta es una técnica de enfoque

30 basada en la migración de los componentes de la muestra entre los electrolitos líder y terminador. Los solutos que tienen movilidades intermedias entre las de los electrolitos líder y terminador se apilan en zonas enfocadas y definidas (*Analytical Biochemistry*. Addison Wesley Longman Tercera Edición Limitada, 1998). Un ejemplo típico de las aplicaciones electroforéticas que pueden operar en el modo de isotacoforesis es la denominada electroforesis capilar.

35 [0005] La electroforesis de zona es otro modo de operación bien conocido. La electroforesis de zona se basa en la diferencia entre el valor de movilidad electroforética de las partículas que se van a separar y del medio de separación empleado. La electroforesis de zona hace posible el aislamiento de analitos y partículas en base a la diferencia de tamaño y/o forma y/o carga superficial neta. Para la puesta en práctica satisfactoria de la electroforesis de zona es importante la homogeneidad (pH constante) de la solución de separación y de la intensidad del campo constante a

40 través de toda la zona de separación.

[0006] Los modos de operación generales mencionados anteriormente se pueden aplicar a varias tecnologías electroforéticas diferentes tales como electroforesis sobre soporte sólido (tal como papel de filtro, acetato de celulosa, agarosa, etc.), electroforesis capilar y electroforesis de flujo libre (FFE).

45 [0007] Entre todas las tecnologías electroforéticas, la electroforesis de flujo libre (FFE) es una de las más prometedoras [Krivanova L. y Bocek P. (1998), "Continuous free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 19: 1064-1074]. La FFE es una tecnología en la cual la separación de los analitos se produce en un medio líquido en ausencia de una fase estacionaria (o de un material de soporte sólido) para minimizar la pérdida de muestra por absorción. La FFE se denomina a menudo

50 electroforesis de deflexión sin portador o electroforesis de deflexión libre de matriz.

[0008] En el campo de la proteómica, la FFE es la tecnología de elección para la separación previa definida de muestras de proteínas complejas en términos de sus valores variables de pI (punto isoeléctrico). Usando la FFE, se pueden separar biopartículas tales como células en base a la movilidad electroforética de las células. Los principios correspondientes ya se han descrito [por ejemplo, Bondy B., Bauer J., Seuffert I. y Weber G. (1995), "Sodium chloride in separation medium enhances cell compatibility of free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 16: 92-97], pero la FFE ha recibido poco reconocimiento dado que la mayoría de los tipos celulares difieren solo mínimamente en términos de su carga superficial, haciendo difícil la separación de estos tipos celulares. Uno de los primeros refinamientos fue la introducción de la inmuno-FFE que permitió la unión de anticuerpos específicos a epítomos de superficie específicos de

60 las células que se iban a separar, haciendo posible modificar la movilidad electroforética de estas células en la FFE al modificar la carga neta de la superficie celular [por ejemplo, Hansen E. y Hannig K. (1982), "Antigen-specific electrophoretic cell separation (ASECS): Isolation of human T and B lymphocyte subpopulations by free-flow electrophoresis after reaction with antibodies", *J. Immunol. Methods* 11,51: 197-208].

65 [0009] El procedimiento de FFE se ha mejorado, por ejemplo, a través de medios de estabilización y medios de

contracorriente. Esto se refleja, por ejemplo, en la patente US 5.275.706. Según esta patente, se introduce un medio de contracorriente en el espacio de separación en contra de la dirección de flujo continuo del medio de separación neto y la muestra que se desplaza entre los electrodos. Ambos medios (los medios de separación y los medios de contracorriente) se descargan o se eluyen a través de salidas de fraccionamiento, típicamente en una placa de microtitulación, resultando en un procedimiento de fraccionamiento que tiene un bajo volumen muerto. Además, se mantiene un flujo laminar de los medios en la región de las salidas de fraccionamiento.

[0010] Una técnica de FFE particular denominada FFE de intervalo se desvela, por ejemplo, en la patente US 6.328.868. En esta patente, se introducen tanto la muestra como el medio de separación en una cámara de electroforesis, y a continuación se separan usando un modo de electroforesis tal como electroforesis de zona, isotacoforesis, o isoelectroenfoco y, finalmente, se expulsan de la cámara a través de salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la patente US 6.328.868 describen que el movimiento de los medios de separación y de la muestra son unidireccionales, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara, aplicándose una tensión efectiva que hace que se produzca la migración electroforética, mientras que la muestra y los medios no se conducen hidráulicamente desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida, a diferencia de la técnica usada habitualmente en la técnica, en la cual la muestra y los medios pasan a través del aparato mientras se separan en un campo eléctrico (FFE continua).

[0011] La Solicitud de Patente Internacional WO 02/50524 desvela un método de electroforesis que emplea un aparato con una cámara de separación a través de la cual fluye el medio de separación y que proporciona un espacio de separación definido por un fondo y una cubierta, y espaciadores que separan al uno del otro. Además, este aparato de FFE incluye una bomba para suministrar el medio de separación que entra en la cámara de separación a través de líneas de alimentación de medio y abandona la cámara a través de las salidas. El aparato de FFE también incluye electrodos para aplicar un campo eléctrico dentro del medio de separación y puntos de inyección de muestra para la adición de la mezcla de partículas o analitos y puntos de fraccionamiento para eliminar las partículas separadas mediante FFE en el medio de separación. Las partículas separadas se pueden usar para fines analíticos o para un procesamiento preparativo adicional.

[0012] Se conocen en la técnica una diversidad de medios de separación para la separación de analitos tales como biopartículas y biopolímeros. Por ejemplo, en el libro "Free-flow Electrophoresis", publicado por K. Hannig e IC. H. Heidrich, (ISBN 3-921956-88-9) se publica una lista de medios de separación adecuados para FFE y en particular para FFE de Zona. Todos los medios desvelados en el mismo contienen bases, cuyos valores de pKa son mayores que los valores de pKa de los ácidos usados para el ajuste del pH de los medios de separación finales. Sin embargo, en los medios de separación de la técnica anterior, se observa a menudo una sobrecarga térmica en la cámara de separación de FFE, particularmente con una alta intensidad de campo eléctrico y limita la concentración de los ácidos y bases que se usan en los medios de separación a aproximadamente 10 mM. Por lo tanto, la capacidad amortiguadora de estos medios es mediocre en el mejor de los casos, limitando de esa manera seriamente el tiempo de separación efectivo en condiciones estables.

[0013] La patente US 5.447.612 (Bier *et al.*) desvela otro medio de separación que es un sistema amortiguador del pH para la separación de analitos por isoelectroenfoco mediante formación de gradientes de zonas de pH reducidos funcionalmente estables en solución libre preparados previamente. Emplea componentes tampón en pares tampón complementarios. Los componentes tampón se seleccionan entre anfolitos sencillos químicamente definidos, ácidos débiles y bases débiles, y se emparejan en base a sus características de disociación de modo que proporcionen un gradiente de pH bastante plano de 0,4 a 1,25 unidades de pH. La patente US 5.447.612 no menciona el uso de medios de estabilización.

[0014] Otro problema que afecta a las tecnologías de electroforesis es la inestabilidad causada, entre otros motivos, por la contaminación de los electrodos. Particularmente en la FFE, la contaminación se evita generalmente mediante el uso de membranas semiporosas que aíslan los dos electrodos de la cámara de separación.

[0015] Un enfoque alternativo a las membranas semiporosas mencionadas anteriormente se propone en las solicitudes de patente US 2004/050697 y 2004/050698 y en la solicitud de patente Internacional WO 03/060504. Entre otras cosas, estas solicitudes de patente desvelan la denominada solución amortiguadora de enfoque que se usa para crear un medio amortiguador en la proximidad de los electrodos en los cuales el medio amortiguador de enfoque tiene una mayor conductividad que en el medio de separación. En ausencia de membranas que separen los electrodos de la cámara de separación existe la posibilidad de que las propias partículas se unan fuertemente al electrodo de modo que se produzca una pérdida importante de estas partículas separadas y la contaminación concomitante de los electrodos. Según estas solicitudes, se puede evitar este efecto por medio de una solución amortiguadora de enfoque. Sin embargo, no se ofrece ninguna indicación en las solicitudes de patente US 2004/050697 y 2004/050698 ni en la solicitud de patente Internacional WO 03/060504 en lo que se refiere a los componentes de la solución amortiguadora de enfoque en relación a los medios de separación o a cómo se conseguiría la mayor conductividad.

[0016] La solicitud de patente US 2004/050698 también desvela un aparato de electroforesis de flujo libre que incluye al menos una cámara de separación a través de la cual puede fluir un medio de separación. Además, dicho aparato de

FFE incluye una bomba de dosificación para el transporte de un medio de separación que entra en la cámara de separación a través de líneas de alimentación de medio y abandona dicha cámara a través de salidas, electrodos para aplicar un campo eléctrico en el medio de separación y puntos de inyección de muestra para añadir la mezcla de partículas que se va a separar, y puntos de fraccionamiento para la eliminación del medio de separación de las partículas separadas por medio de la FFE.

Se describe un método de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 por Weber *et al.* en *Electrophoresis*, 21 (2000), páginas 325-328.

10 Descripción resumida de la invención

[0017] A partir de lo expuesto anteriormente es evidente que los medios de separación tampón (y los medios de estabilización) son decisivos para la realización satisfactoria de las tecnologías de electroforesis.

15 [0018] Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos electroforéticos que impliquen medios adicionales que sean capaces de evitar la contaminación cruzada entre el medio de separación y los compartimentos de los electrodos en cualquier dirección y que sean útiles para mantener el perfil de pH y de conductividad durante la FFE, en particular en FF-ZE, FF-IEF y FF-ITP.

20 [0022] En este contexto, los inventores han encontrado que las aplicaciones de electroforesis que emplean los medios de separación proporcionados en la presente memoria consiguen mejores resultados cuando se usan con los denominados medios de estabilización, que se introducen generalmente en la cámara de electroforesis en la vecindad (es decir, cerca de) del cátodo y del ánodo del dispositivo de electroforesis (es decir, entre el cátodo y el medio de separación, y entre el ánodo y el medio de separación), respectivamente.

25 [0023] Los medios de estabilización que se emplean en los métodos de la invención son capaces de estabilizar las condiciones (por ejemplo, pH y conductividad eléctrica) en el espacio de separación del dispositivo de electroforesis, permitiendo de este modo una mejora de la estabilidad de las condiciones electroquímicas y físicas que conducen a un aumento de la precisión, sensibilidad, y reproducibilidad de la separación/fraccionamiento electroforético de los analitos de una muestra.

30 [0025] La invención proporciona nuevos métodos electroforéticos para la separación de analitos y biopartículas. Los métodos permiten una separación controlada, efectiva y reproducible de moléculas en lábiles o sensibles tales como liposomas.

35 [0026] Finalmente, los inventores han encontrado que tanto la separación preparativa como la separación analítica de liposomas, y de otras partículas, se puede conseguir de forma fiable con los nuevos métodos que comprenden los medios de electroforesis desvelados en la presente memoria. Los aspectos mencionados anteriormente se discutirán a continuación con mayor detalle.

40 I. Medios de separación electroforética

[0027] En la presente memoria se proporcionan medios de separación empleados en métodos para la separación de analitos tales como biopartículas o biopolímeros por medio de electroforesis. El medio de separación contiene un ácido tampón y una base tampón, con la condición de que el valor de pKa (es decir, el inverso aditivo del logaritmo decimal de la constante de disociación ácida K_a ; también denominado en ocasiones "logaritmo decimal negativo" de la constante de disociación ácida K_a) del ácido tampón debe ser mayor que el pH del medio de separación y el pKa de la base tampón debe ser menor que el pH del medio de separación. Dicho de otro modo, el pKa del ácido tampón será mayor que el pKa de la base tampón.

50 [0028] El perfil de pH que exhibe el medio de separación puede ser esencialmente lineal (es decir, sin ninguna etapa de pH de importancia durante la separación electroforética). Dependiendo del medio de estabilización empleado así como de la diferencia de pKa entre el ácido tampón y la base tampón, tales medios de separación ofrecerán un perfil de pH prácticamente constante (es decir, plano), o un gradiente de pH bastante suave/plano en la cámara de separación. Se entenderá que los medios de separación que proporcionan una zona con un pH prácticamente constante en la cámara de separación entre los electrodos son particularmente útiles para aplicaciones que operan en el modo de electroforesis de zona (ZE), mientras que los perfiles de gradiente de pH (plano) son particularmente útiles en aplicaciones que operan en modo de isoelectroenfoque (IEF).

60 [0029] Alternativamente, el perfil de pH de los medios de separación durante la electroforesis puede ser no lineal, con una o más etapas o mesetas de pH distintas en el espacio de separación. Tales medios son particularmente útiles en ciertas aplicaciones que operan en modo IEF.

[0030] Preferentemente, los medios de separación que emplean un ácido tampón y una base tampón tienen una diferencia de pKa entre el ácido tampón y la base tampón de aproximadamente 0,5 a 4 unidades de pH, en los cuales el

pKa del ácido debe ser mayor que el pKa de la base como se ha explicado anteriormente. Preferentemente, el ΔpK_a está entre 1,2 y 1,8, que es particularmente útil en electroforesis de zona, o ΔpK_a estará entre aproximadamente 2,5 y 4 o, más preferentemente, entre aproximadamente 2,5 y 3,3, siendo esta última particularmente adecuada para aplicaciones de IEF de gradiente de pH plano.

5

[0031] Una característica de los medios de separación proporcionados en la presente memoria es que la conductividad eléctrica del medio es relativamente baja, aunque se entenderá que la conductividad debe ser lo suficientemente alta para conseguir una separación aceptable de los analitos en una cantidad razonable de tiempo. Así, la conductividad de los medios de separación está típicamente entre 50 y 1000 $\mu S/cm$, y más preferentemente entre 50 y 500 $\mu S/cm$, aunque los expertos en la materia serán conscientes de que la conductividad exacta del medio de separación dependerá por supuesto de los detalles del problema de separación/fraccionamiento, de la presencia de otras especies cargadas en el medio (por ejemplo, iones que se requieren para la estabilidad de la muestra/analito) y de las propiedades electroquímicas del analito.

15 [0032] En los métodos de la presente invención, los medios de separación comprenden solamente un ácido tampón y una base tampón. En otras palabras, tales medios de separación representan medios binarios (medios A/B) en los cuales una función de ácido de un compuesto y una función de base del otro compuesto sirven fundamentalmente para establecer el medio de separación con el perfil deseado de pH y de conductividad. Mientras que también se pueden conseguir buenos resultados con dos o más ácidos tampón y bases tampón en el medio de separación, es típicamente
20 ventajoso usar el menor número de componentes posible, no solo porque es más fácil de preparar y, posiblemente, su uso es más barato, sino también porque las propiedades electroquímicas del medio se volverán más complejas si se aumenta el número de especies cargadas presentes en la cámara de separación.

[0033] Los medios de separación descritos en la presente memoria pueden comprender además aditivos tales como aniones y cationes mono y divalentes "esenciales" (que se requieren, por ejemplo, para la estabilidad/funcionalidad de la muestra), potenciadores de la viscosidad, detergentes, agentes de solubilización de proteínas, ligandos de afinidad, agentes reductores y similares.

30 II. Medios de estabilización

30 II.1. *Propiedades generales*

[0035] En los métodos de la presente invención, los denominados "medios de estabilización" se usan para estabilizar las condiciones electroquímicas en la cámara de separación mediante la prevención de efectos o artefactos no
35 deseados que de lo contrario se pueden observar durante el proceso de separación electroforética, en particular en la electroforesis de flujo libre.

[0036] Los medios de estabilización se localizan generalmente en la vecindad de los electrodos, es decir, entre el ánodo/cátodo y el medio de separación, respectivamente. Los medios de estabilización tienen una conductividad
40 eléctrica mayor que el medio de separación usado con los medios de estabilización. La mayor conductividad evita la contaminación cruzada entre el área de separación y el compartimento del electrodo del dispositivo de electroforesis y también sirve para evitar la acumulación no deseada en los electrodos de las partículas o analitos separados. Además, todos los compuestos tales como iones, aditivos y similares que se requieren en el medio de separación se pueden suministrar o reponer a partir del medio de estabilización presente en la vecindad del cátodo y del ánodo,
45 respectivamente.

[0037] Mientras que el concepto general de medios de estabilización que tienen alta conductividad eléctrica se ha mencionado brevemente en la técnica (por ejemplo, en el documento WO 03/060503), no se ofrece ninguna información sobre cómo conseguir la conductividad deseada en el contexto de las aplicaciones electroforéticas. En particular, no se
50 presenta ninguna enseñanza en la técnica de cómo desarrollar medios de estabilización que eviten efectos y artefactos no deseados durante la separación y que se puedan usar universalmente, es decir, en prácticamente todas las disposiciones, incluyendo electroforesis de flujo libre, así como para todos los modos básicos de operación (ZE, IEF, e ITP). Mientras que el concepto de la invención con respecto a los medios de estabilización, según las realizaciones de la presente invención, es básicamente común para todos los modos de operación, se entenderá que los medios de
55 estabilización pueden requerir ciertas características específicas dependiendo del modo de operación (ZE, IEF, o ITP) seleccionado para el uso destinado.

[0038] Por lo tanto, los medios de estabilización empleados en los métodos de la presente invención comprenden al menos un ácido tampón y al menos una base fuerte (medio de estabilización catódico, CSM), o comprenden al menos
60 una base tampón y al menos un ácido fuerte (medio de estabilización anódico, ASM). El ácido fuerte y la base fuerte, respectivamente, tienen que estar presentes en una concentración suficiente para conseguir una ionización/protonación considerable de la al menos una base tampón (ASM), o una ionización/desprotonación considerable del ácido tampón (CSM), para obtener una conductividad eléctrica suficientemente alta, es decir, mayor que la conductividad del medio de separación.

65

[0039] La concentración de la al menos una base tampón (ASM) y del al menos un ácido tampón (CSM) debería ser lo suficientemente alta para asegurar que el ácido o la base fuerte, respectivamente, puedan producir un número suficiente de las moléculas cargadas que se requieren para la alta conductividad deseada. Así, en las realizaciones preferentes de este aspecto de la presente invención, la concentración de la base tampón (ASM) o del ácido tampón (CSM) se
5 aumenta aproximadamente de 5 a 15 veces con respecto a la concentración de los ácidos tampón (para ASM)/bases tampón (para CSM) del medio de separación.

[0040] Mientras que las concentraciones absolutas en el medio de estabilización variarán dependiendo de la concentración de los ácidos/bases tampón en el medio de separación, las concentraciones típicas para los ácidos/bases
10 tampón en el medio de estabilización son típicamente no inferiores a 20 mM, y son habitualmente mucho mayores (por ejemplo, aproximadamente 50 mM, o incluso más de 200 mM). Los ácidos tampón adecuados deberían tener generalmente un pKa entre aproximadamente 3 y 13, mientras que las bases tampón adecuadas deberían tener generalmente un pKa entre aproximadamente 1,5 y 12.

[0041] El medio de estabilización catódico (CSM) puede comprender además una o más bases tampón, con la condición de que la concentración de todos los ácidos del CSM sea mayor que la concentración de todas las bases. De forma similar, el medio de estabilización anódico (ASM) puede comprender además uno o más ácidos tampón, con la condición de que la concentración de todas las bases del ASM sea mayor que la concentración de los ácidos.

[0042] Además, al igual que en el caso de los medios de separación, los medios de estabilización también pueden comprender aditivos, que son típicamente los mismos que los añadidos al medio de separación, aunque muchos de los aditivos a menudo pueden estar presentes en una mayor concentración en concordancia con la mayor concentración de los ácidos/bases tampón en los medios de estabilización en comparación con el medio de separación.

[0043] La conductividad eléctrica de los medios de estabilización será asimismo dependiente en gran medida de la conductividad del medio de separación usado para la separación electroforética. Como regla general, la conductividad eléctrica de los medios de estabilización debería ser al menos de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 5 veces, e idealmente incluso 10 veces, mayor que la conductividad del medio de separación. Los valores de conductividad típicos observados en los medios de estabilización son típicamente más de aproximadamente 500 μS , a
30 menudo más de aproximadamente 1000 o incluso 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y en ciertos casos pueden incluso alcanzar 10.000 o 20.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

[0044] En cualquier caso, los expertos en la materia entenderán que el valor real de la conductividad de los medios de estabilización dependerá de las condiciones específicas del problema de separación/fraccionamiento y en circunstancias particulares puede estar incluso fuera de los intervalos mencionados anteriormente, con la condición de que la conductividad de los medios de estabilización sea al menos considerablemente mayor que la del medio de separación.

[0045] Como se explicará posteriormente con mayor detalle, la selección real de los ácidos tampón y de las bases tampón dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la naturaleza del analito y el modo de operación de la aplicación electroforética. Por ejemplo, en la electroforesis de zona, el pH en el medio de separación debe ser prácticamente constante, mientras que para las aplicaciones de isoelectroenfoque, en el área de separación entre los electrodos está presente un gradiente de pH o distintas mesetas de pH. Dependiendo de la naturaleza del problema de separación electroforética y del modo de operación usado, los expertos en la materia entenderán que, por lo tanto, se
45 aplicarán diferentes criterios de selección para la identidad y la concentración de los componentes de los medios de de estabilización de la presente invención.

II.2. Medios de estabilización para electroforesis la zona (ZE)

[0046] Los medios de estabilización pueden comprender al menos un ácido tampón (CSM) o al menos una base tampón (ASM) que también está presente en el medio de separación. Alternativamente, los ácidos tampón y las bases tampón del CSM y del ASM, respectivamente, se seleccionan para tener una movilidad electroforética similar y un pKa que sea muy cercano al pKa del respectivo ácido tampón/base tampón del medio de separación.

[0047] Mediante la selección de ácidos tampón y bases tampón según los criterios anteriores, es posible proporcionar medios de estabilización que aseguren un pH prácticamente plano en toda el área formada por el medio de separación, en combinación con los medios de separación proporcionados en la presente memoria. Así, los medios de estabilización mencionados anteriormente son particularmente adecuados para la electroforesis de zona de flujo libre (FF-ZE).

II.3. Medios de estabilización para isoelectroenfoque (IEF)

[0048] El al menos un ácido tampón (CSM) o la al menos una base tampón (ASM) del medio de estabilización se puede seleccionar para tener un pKa que sea mayor que el pI del analito más alcalino de la muestra que se va a separar (ácidos tampón del CSM), o menor que el pI del analito más ácido de la muestra (bases tampón del ASM).

65

[0049] Otro criterio de selección que se puede usar para la selección de los compuestos tampón de los medios de estabilización, además o como alternativa a la definición mencionada anteriormente basada en el pI del analito más alcalino/ácido de interés, es que el pKa del al menos un ácido tampón (CSM) debería ser mayor que el pH máximo del medio de separación y el pKa de la al menos una base tampón (ASM) debería ser menor que el pH mínimo del medio de separación.

[0050] En cualquier caso, los ácidos tampón del CSM se deberían seleccionar para asegurar que el pH del medio de estabilización catódico resultante sea mayor que el pI del analito más alcalino de la muestra, y será habitualmente mayor que el pH máximo del medio de separación en el modo de operación IEF (es decir, el que exhibe un gradiente de pH en aumento desde el ánodo hacia el cátodo). Preferentemente, sin embargo, el pH del medio de estabilización catódico no debería exceder el pH máximo del medio de separación en más de aproximadamente 2 unidades de pH para evitar alteraciones en la interfase de separación y en el medio de estabilización. De forma similar, el pH del medio de estabilización anódico debería ser menor que el pH más bajo del medio de separación, pero se debería seleccionar preferentemente para proporcionar un ASM en el cual el pH no sea menor de aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pH más bajo del medio de separación.

[0051] Los medios de estabilización de IEF pueden comprender más de un ácido tampón (CSM) y más de una base tampón (ASM). En estos casos, la concentración de los ácidos tampón (CSM) y de las bases tampón (ASM) más débiles, respectivamente, debería ser mayor que la concentración del ácido tampón más fuerte (CSM)/base tampón más fuerte (ASM).

[0052] Estos medios de estabilización son particularmente adecuados para FF-IEF, y los más ventajosos son en los que el gradiente de pH en el medio de separación es relativamente plano (por ejemplo, no más de 3 unidades de pH de diferencia entre el lado anódico y el lado catódico del medio de separación).

25

11.4. Medios de estabilización para isotacoforesis (ITP)

[0053] Los medios de estabilización pueden ser particularmente útiles para la estabilización de las condiciones electroforéticas cuando se opera en modo de isotacoforesis (ITP). Dado que la separación electroforética en ITP se basa en las diferentes movilidades electroforéticas de las diversas especies presentes en la solución, los expertos en la materia entenderán que no existen compuestos tampón "de fondo" en la solución, sino que cada especie (cargada) se moverá a través de la solución a una velocidad que corresponde a su movilidad electroforética. Por lo tanto, en la ITP se puede diferenciar habitualmente entre el líder (especies (iones) cargados que tienen la mayor movilidad electroforética) y el terminador (especies cargadas que tienen la menor movilidad electroforética). Dependiendo del problema de separación y de si el analito está cargado positiva o negativamente, se debe distinguir entre ITP catiónica en la cual las especies se desplazan hacia el cátodo, e ITP aniónica en la cual las especies de la solución se desplazan hacia el ánodo.

[0054] En la ITP aniónica, el aumento de conductividad necesario para la estabilización del lado anódico (es decir, el ASM) se consigue habitualmente aumentando la concentración del ion líder (por ejemplo, los iones cloruro de un ácido fuerte tal como HCl) y del respectivo contraion, que es habitualmente una base tampón. Sin embargo, este concepto no funcionará habitualmente para el lado catódico, debido a que las especies más lentas (es decir, el terminador) que tienen la movilidad electroforética más lenta (y por lo tanto, la carga (superficial) neta más baja) se acumularán cerca del cátodo.

45

[0055] Por lo tanto, el medio de estabilización catódico para la ITP aniónica comprende el terminador (es decir, el compuesto que tiene la movilidad electroforética más lenta) y al menos una base fuerte (por ejemplo, NaOH). El compuesto terminador se selecciona habitualmente entre un ácido tampón, donde el pKa de dicho ácido tampón es preferentemente mayor que el pKa de la base tampón del medio de estabilización anódico líder. La concentración de la base fuerte añadida al medio de estabilización catódico es preferentemente menor que la concentración del ácido tampón en el mismo medio, pero lo suficientemente alta para asegurar un alto grado de ionización para conseguir la alta conductividad deseada.

[0056] Por supuesto, los mismos principios de selección son aplicables para los problemas de separación catiónica en los cuales el terminador está en el lado del ánodo. Así, el medio de estabilización anódico (ASM) adecuado para la ITP catiónica debe comprender el terminador (preferentemente una base tampón) y al menos un ácido fuerte (por ejemplo, HCl). Como en el caso de la ITP aniónica descrita anteriormente, la concentración del ácido fuerte en el ASM es preferentemente menor que la concentración de la base tampón en el mismo medio, pero lo suficientemente alta para asegurar un alto grado de ionización para conseguir la alta conductividad deseada.

60

[0057] De forma similar al ASM en la ITP aniónica, el medio de estabilización catódico (CSM) en la ITP catiónica comprendería de nuevo una concentración aumentada de los iones líder (por ejemplo, iones potasio o sodio proporcionados por una base fuerte) y del contraion respectivo, que es habitualmente una base tampón.

[0058] Las aplicaciones posibles para los medios de estabilización serán evidentes para los expertos en la materia e

incluyen aplicaciones de electroforesis de flujo libre para separación/fraccionamiento preparativo o analítico de analitos en una muestra. Los medios de estabilización descritos en la presente memoria serán particularmente útiles para la separación de biopartículas (incluyendo partículas grandes y sensibles tales como células, orgánulos, complejos de proteínas, virus, etc.) a través de electroforesis de flujo libre operada en modo de electroforesis de zona (FF-ZE), isotacoforesis (FF-ITP) o isoelectroenfoque (FF-IEF), o cualquier combinación de los anteriores.

III. Kits

[0060] Los métodos de la presente invención pueden utilizar kits, que comprenden los medios de separación junto con los medios de estabilización. Los diversos medios contenidos en los kits pueden estar presentes como soluciones acuosas listas para uso o concentradas, o pueden comprender los diversos compuestos en forma seca o liofilizada que se reconstituyen directamente antes de su uso.

IV. Aplicaciones específicas

[0063] La presente invención proporciona un método de electroforesis que se aplica ampliamente para la separación/fraccionamiento de una diversidad de analitos, incluyendo poblaciones de liposomas que tienen composiciones variables y por lo tanto propiedades fisicoquímicas diferenciables, en el cual se consigue una separación/fraccionamiento particularmente ventajoso en un medio de separación que tiene una conductividad eléctrica menor de aproximadamente 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

[0064] Según la presente invención, se proporcionan métodos de electroforesis que comprenden (a) introducir en una cámara de electroforesis un medio de estabilización anódico, un medio de estabilización catódico y un medio de separación; (b) introducir en el medio de separación uno o más analitos; (c) someter a los medios y a los analitos a un campo electroforético; y, opcionalmente, (d) eluir todos o parte de los analitos desde la cámara de electroforesis.

[0065] Preferentemente, la separación/fraccionamiento se consigue usando electroforesis de flujo libre operada en modo de electroforesis de zona (FF-ZE) que se caracteriza por un pH estable y constante sobre toda el área de separación, incluso con una duración prolongada de la electroforesis. Alternativamente, la separación/fraccionamiento se consigue mediante isoelectroenfoque, en el cual el medio de separación forma un gradiente (plano o ultraplano) en la cámara de electroforesis (FF-IEF).

[0066] Se han conseguido resultados favorables usando los medios de separación y de estabilización de FF-ZE o FF-IEF, por ejemplo con el aparato de electroforesis de flujo libre comercializado como Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™.

[0067] Según una realización, se proporcionan métodos de electroforesis que comprenden la etapa de proporcionar un medio de separación que tiene un perfil de pH generalmente plano y una conductividad generalmente menor de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, junto con un medio de estabilización catódico y anódico, e introducir una muestra que contiene una diversidad de analitos, al menos una parte de la cual tiene propiedades de carga superficial únicas y diferenciables, en el medio de separación, y separar los analitos mediante electroforesis de zona. La separación se llevará a cabo en un ambiente libre de matriz, es decir, mediante electroforesis de flujo libre.

Breve descripción de las figuras

[0068] La **Figura 1** representa una representación esquemática de un dispositivo adecuado para realizar un método de FFE según la presente invención que contiene 7 entradas de medios E1 a E7 y una entrada de muestra S. Obsérvese que se pueden colocar una o más entradas de muestra en cualquier posición deseada entre los dos electrodos. Además, la entrada de muestra se puede colocar cerca de las entradas de medios o más corriente abajo hacia los extremos de salida del dispositivo, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

[0069] La **Figura 2** ilustra los resultados de una separación de FFE catiónica operada en modo de electroforesis de zona (FF-ZE) como se describe posteriormente en el Ejemplo 1. La **Figura 2A** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar de 96 pocillos) e indica el pH de las fracciones. Los marcadores de pl coloreados se separaron para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la **Figura 2A**, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420 \text{ nm}$, 515 nm y 595 nm , que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. La **Figura 2B** representa el gel de SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones indicando la presencia de analitos fraccionados en la muestra.

[0070] La **Figura 3** ilustra los resultados de una separación de FF-ZE catiónica y aniónica simultánea como se describe posteriormente en el Ejemplo 2. La **Figura 3A** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar) y muestra el pH de las fracciones. Los marcadores de pl coloreados se separaron para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la **Figura 3A**, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420 \text{ nm}$, 515 nm y 595 nm que

representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. La **Figura 3B** representa el gel de SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones indicando la presencia de analitos fraccionados en la muestra.

5 **[0071]** La **Figura 4** ilustra los resultados de otra separación de FF-ZE aniónica con un sistema de medios diferente como se describe posteriormente en el Ejemplo 3. La **Figura 4A** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) y representa el pH de las fracciones entre el ánodo y el cátodo. Los marcadores de pl coloreados se separaron para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la **Figura 4A**, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. La **Figura 4B** representa el gel de SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones indicando la presencia de analitos fraccionados en la muestra.

15 **[0072]** La **Figura 5** ilustra los resultados de otra separación de FF-ZE fraccionada de una muestra de control de calidad como se describe en el Ejemplo 4. De nuevo, se representa la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes frente al pH de las fracciones.

15 **[0073]** La **Figura 6** muestra los resultados de una separación de FFE fraccionada operada en modo de isoelectroenfoque (FF-IEF) como se describe adicionalmente en el Ejemplo 5.

20 **[0074]** La **Figura 7** ilustra los resultados de otra separación de FF-IEF fraccionada como se describe adicionalmente en el Ejemplo 6.

25 **[0075]** La **Figura 8** muestra la separación de FFE fraccionada de una muestra en un gradiente de pH ultraplano (FF-IEF ultraplana) como se describe en el Ejemplo 7 con el pH de las fracciones representado frente a la absorbancia a tres longitudes de onda diferentes.

30 **[0076]** La **Figura 9** representa la separación fraccionada en modo FF-ITP aniónico de una muestra descrita en detalle en el Ejemplo 8. Los marcadores de pl coloreados se separaron para evaluar el rendimiento de separación del sistema. La absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl se representa frente al pH de las fracciones.

35 **[0077]** La **Figura 10** representa el flujo neto global de muestra y medios de separación para electroforesis de solución libre cíclica de intervalos, como se usa en ciertos aspectos de las realizaciones descritas en la presente solicitud. Las etapas a, b, c, d, y e representadas en las **Figuras 10a a 10e** respectivamente demuestran cómo las partículas a, b, c, y d que se muestran agrupadas en la **Figura 10b** se fraccionan en la **Figura 10c** a través de un flujo cíclico de la muestra y de los medios de separación, que se cicla generalmente de forma paralela a los electrodos de los lados izquierdo y derecho de la cámara de electroforesis. Como se representa en la **Figura 10**, la muestra y los medios de separación entran a través de la parte inferior de la cámara y, después del ciclado, salen en un estado de post-electroforesis a través de la parte superior de la cámara.

40 **[0078]** La **Figura 11** ilustra los resultados de una separación de FFE aniónica operada en electroforesis de zona (FF-ZE) como se describe posteriormente en el Ejemplo 9. La **Figura 11A** muestra la separación fraccionada de la muestra entre el ánodo (izquierda) y el cátodo (derecha) (96 fracciones recogidas en una placa de microtitulación estándar) e indica el pH de las fracciones. Los marcadores de pl coloreados se separaron para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la **Figura 11A**, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. La **Figura 11B** representa el gel de SDS correspondiente obtenido para las diversas fracciones indicando la presencia de analitos fraccionados en la muestra.

Descripción detallada de la invención

50 **[0079]** Como será evidente a partir de los Ejemplos que se discuten posteriormente en la presente memoria, los medios de separación y de estabilización se pueden preparar fácilmente, generalmente no son peligrosos, y proporcionan condiciones electroforéticas estables y reproducibles para una separación/fraccionamiento potente y sensible (o una disminución o enriquecimiento selectivo) de los analitos de una muestra mediante electroforesis.

55 **[0080]** Los medios de separación así como los medios de estabilización están habitualmente en forma de soluciones acuosas que tienen un número limitado de componentes. Por supuesto, los medios también se pueden proporcionar en forma de una solución concentrada que se diluye hasta la concentración apropiada o incluso en forma seca (por ejemplo, cristalina, amorfa o incluso liofilizada), que comprenden los diversos ingredientes del medio en un envase único o distribuidos en varios envases (por ejemplo, en forma de kit). Los ingredientes secos se pueden reconstituir a continuación con agua antes de la aplicación de electroforesis.

65 **[0081]** Un medio de separación como se usa en la presente invención se debería entender que representa en su forma lista para uso un medio acuoso que está presente en el espacio de separación o en la cámara de separación entre el ánodo o ánodos y el cátodo o cátodos de un aparato de electroforesis. La muestra que se va a separar/fraccionar se añade a o con el medio de separación, y a continuación se separan los diversos analitos de la muestra en el medio de

separación mediante la aplicación de un campo eléctrico. Los analitos (fraccionados) de interés se recogen posteriormente, típicamente en un número adecuado de fracciones, desde el aparato de electroforesis (aplicaciones preparativas), o al menos se detectan por medios adecuados (aplicaciones analíticas).

5 **[0082]** Los medios de estabilización como se usan en la presente invención se introducen típicamente en el dispositivo de electroforesis cerca del ánodo y del cátodo, respectivamente. Los medios de estabilización, entre otras cosas, evitan que los iones hidronio (H_3O^+) y los iones hidroxilo (OH^-) creados en los electrodos durante la electroforesis pasen al espacio de separación, cambiando o desestabilizando de ese modo las condiciones electroquímicas en el espacio de separación. A la vista de la mayor conductividad de los medios de estabilización de la presente invención en
10 comparación con el medio de separación, los medios de estabilización crearán "barreras de conductividad" que, entre otras cosas, también evitan que, con el tiempo, los analitos cargados eléctricamente entren en contacto con los electrodos.

[0083] Los nuevos conceptos para el diseño de medios de separación y de estabilización se aplican, según la presente
15 invención, a la electroforesis de flujo libre (FFE), tanto en condiciones nativas (es decir, sin alterar la integridad estructural de los analitos) como en condiciones de desnaturalización (por ejemplo, en presencia de urea, tiourea, SDS, etc.).

[0085] Mientras que los métodos proporcionados en la presente memoria no se limitan a analitos específicos, se
20 entenderá que son particularmente adecuados para la separación/fraccionamiento de muestras biológicas, o al menos de analitos relativamente sensibles (por ejemplo, liposomas) habida cuenta de las composiciones bien definidas y de su fácil reproducibilidad. Los analitos típicos que se pueden separar incluyen, pero no se limitan a, biopartículas y biopolímeros, que pretenden incluir, pero no se limitan a, células, orgánulos celulares, virus, o partículas víricas, proteínas, complejos de proteínas, agregados de proteínas, ADN, complejos ADN-proteína, membranas, péptidos,
25 cromatina, nanotubos, liposomas, cualquier combinación de los mismos, y similares.

[0087] Como se explica posteriormente con mayor detalle, la separación/fraccionamiento se consigue a través de electroforesis de flujo libre (FFE). Los dispositivos de FFE adecuados se conocen en la técnica y se comercializan, por ejemplo, con el nombre comercial de Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ (BD GmbH, Alemania). Además, los
30 dispositivos de FFE adecuados que se pueden usar con los medios de separación y de estabilización de la presente invención se han descrito en una diversidad de solicitudes de patentes, incluyendo la patente US 5.275.706, la patente US 6.328.868, las solicitudes de patente US pendientes de publicación US 2004/050697, US 2004/050698, US 2004/045826, o US 2004/026251, y los documentos intermediarios WO 2008/053047 y WO 2008/025806.

35 I. Medios electroforéticos de separación

[0088] Los presentes inventores han encontrado que los medios de separación acuosos sencillos que tienen solamente un número limitado de ingredientes diferentes se pueden usar para la separación eficiente y altamente sensible de analitos, con la condición de que sus ingredientes se seleccionen según los criterios específicos que se perfilan con
40 mayor detalle a continuación. Los conceptos y los medios resultantes presentados en la presente memoria se caracterizan por su considerable flexibilidad, que permite que los expertos en la materia adapten los medios de separación (y de estabilización) exactamente al problema de separación específico y a las propiedades del analito o analitos de interés.

[0089] Por lo tanto, los métodos de la presente invención emplean medios de separación adecuados para la separación de analitos en una muestra mediante electroforesis que contienen un denominado "ácido tampón" y una "base tampón", en los cuales el valor de pKa del ácido tampón es mayor que el pH del medio de separación y el valor de pKa de la base tampón es menor que el pH del medio de separación. Cuando se aplica a un ácido, los expertos en la materia conocerán que un valor de pKa mayor indica un ácido más débil, mientras que para las bases, un valor de pKa menor
50 indica una base más débil.

[0090] Un ácido tampón según la presente invención se pretende que incluya cualquier compuesto químico que tenga al menos una función de ácido, es decir, el compuesto debe ser capaz de donar un protón en una reacción (ácido de Bronsted-Lowry). De forma similar, una base tampón según la presente invención se pretende que incluya un
55 compuesto que tenga al menos una función de base, es decir, el compuesto debe ser capaz de aceptar un protón en una reacción. Sin embargo, los ácidos tampón según la presente invención también pueden tener más de una función de ácido, y pueden tener incluso una función de base adicional (los últimos conducen a los denominados "compuestos anfotéricos") con la condición de que el pKa de la función básica esté separado al menos > 4 unidades de pK del pKa de la función de ácido (no contribuyendo o influenciando de esa manera básicamente en el equilibrio de la función de ácido). Asimismo, la base tampón también puede comprender funciones de base adicionales e incluso una función de
60 ácido, de nuevo con la condición de que el pKa de la función de ácido de la base tampón esté suficientemente separado del pKa de la función básica (> 4 unidades de pK).

[0091] Como se conoce bien en la técnica, el pKa de un compuesto determina la fracción de la función de ácido que
65 ésta desprotonada y la fracción que todavía tiene unido el átomo de hidrógeno, a un pH determinado en condiciones de

equilibrio. Por ejemplo, en el caso de ácidos monofuncionales, el 50% del compuesto ésta desprotonado (aumentando así la carga negativa del compuesto) cuando el pH de la disolución acuosa es igual al pKa del compuesto determinado. Cuando el pKa es una unidad mayor que el pH de la solución, solamente el 10% del compuesto estará desprotonado, mientras que estará desprotonado el 90% con un pKa una unidad por debajo del pH.

5

[0092] Para que sea útil como ácido tampón para los medios de separación, al menos una pequeña fracción del ácido tampón debería estar desprotonada y una pequeña fracción de la base tampón debería estar protonada, a un pH o intervalo de pH determinado, para proporcionar un número suficiente de especies cargadas a la solución que se requieren para conseguir una conductividad eléctrica adecuada en el medio de separación.

10

[0093] La base tampón debería tener asimismo una basicidad (que se expresa, por facilidad de referencia, mediante el valor de pKa (es decir, acidez) del ácido correspondiente) que resulte, a un pH determinado, en una cierta fracción que está protonada, y otra fracción en la cual el compuesto todavía no se ha unido al protón.

15 **[0094]** En otras palabras, los expertos en la materia entenderán que el valor de pKa (que indica la "fuerza" de un ácido o de una base) de los ácidos tampón y de las bases tampón no debería ser demasiado diferente del pH del medio de separación. En este contexto, se debe observar que la referencia al pH del medio de separación se debería entender que se refiere al pH del medio acuoso que incluye todos los componentes antes de aplicar un campo eléctrico. Tal pH se puede determinar fácilmente, por ejemplo, mediante medidores de pH convencionales antes de introducir el medio en el espacio de separación del aparato de electroforesis. Dependiendo de los contenidos del medio de separación y de estabilización, se entenderá que la aplicación de un campo eléctrico puede conducir a la formación de un gradiente de pH en el medio de separación, de modo que el medio de separación no vuelva a tener un pH uniforme a lo largo de todo el espacio de separación. Así, a menos que se indique otra cosa, cualquier referencia al pH del medio de separación en la presente solicitud siempre se refiere al pH antes de la aplicación del campo eléctrico.

25

[0095] Los expertos en la materia podrán calcular el pH de una solución acuosa cuando se conozcan los valores de pKa y las concentraciones de los ácidos y de las bases en la solución (por ejemplo, aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch). Por ejemplo, una solución equimolar de un ácido que tiene un pKa de 8,0 y de una base que tiene un pKa de 6,0 resultará en una solución que tiene un pH de 7,0 ($pKa[\text{ácido}] + pKa[\text{base}]/2$).

30

[0096] En base a las consideraciones anteriores, se debería entender que la condición de que el pKa del ácido tampón deba ser mayor que el pH del medio de separación y que el pKa de la base tampón deba ser menor que el pH del medio de separación, resulta en una condición de equilibrio en la cual generalmente menos de un 50% del ácido tampón estará desprotonado y menos de un 50% de la base tampón estará protonada, respectivamente. Se debería entender además que un ácido que tiene un pKa más de aproximadamente 3 unidades por encima del pH del medio de separación no contribuirá con un número considerable de protones (es decir, estará presente básicamente en su forma ácida) con la consecuencia de que la conductividad eléctrica de la solución será demasiado baja para una buena separación en una cantidad de tiempo razonable.

40 **[0097]** Para expresarlo de forma diferente, para los medios de separación usados en la presente invención, el valor de pKa del ácido tampón del medio de separación debería ser mayor que el valor de pKa de la base tampón.

[0098] En general, los ácidos tampón y las bases tampón se seleccionan de modo que el pH del medio de separación esté en un intervalo de aproximadamente 2 a 12, aunque, preferentemente, el pH estará en algún lugar en el intervalo de aproximadamente 3 a 11. Dado que los problemas de separación típicos incluirán muestras de origen biológico, los valores de pH preferentes del medio de separación (a pH constante o bien los puntos extremos de un gradiente de pH) variarán a menudo entre pH 4 y 10, o incluso entre pH 5 y 9. Numerosas separaciones, sin embargo, deberían o tienen que llevarse a cabo a, o cerca de, un pH neutro, es decir, típicamente entre pH 6 y 8 o incluso entre 6,5 y 7,5, aunque el pH del medio de separación dependerá por supuesto del problema de separación específico y de la naturaleza de los analitos.

50

[0099] Por lo tanto, los medios de separación usados en la presente invención comprenden solamente un ácido tampón y solamente una base tampón.

55 **[0100]** En ciertas realizaciones, el perfil de pH en los medios de separación de la presente invención durante la electroforesis será prácticamente lineal (en contraste con exhibir distintas etapas de pH) entre el ánodo y el cátodo durante la electroforesis. En algunas realizaciones, el pH en el medio de separación formará un gradiente (lineal), mientras que en otras realizaciones, el pH durante la electroforesis permanecerá prácticamente constante.

60 **[0101]** En otras realizaciones, el perfil de pH en los medios de separación de la presente invención durante la electroforesis será prácticamente no lineal, es decir, el perfil de pH puede exhibir distintas etapas o mesetas de pH.

[0102] Se pueden permitir, por supuesto, pequeñas desviaciones del pH durante la electroforesis en los sistemas de los medios de separación, particularmente en la interfase de los medios de estabilización presente entre el medio de separación y los electrodos. Así, un pH prácticamente constante en el medio de separación significa que el pH se puede

65

desviar algo en cualquiera de las dos direcciones.

[0103] Preferentemente, la diferencia entre el pH mínimo y el pH máximo en el medio de separación que tiene un pH prácticamente constante no debería exceder de aproximadamente 0,2 unidades de pH, aunque la diferencia debería ser idealmente tan pequeña como sea posible, por ejemplo, menos de aproximadamente 0,1 unidades de pH, y más preferentemente menos de 0,05 unidades de pH. Estos medios de separación son particularmente útiles para separaciones electroforéticas que operan en el modo de electroforesis de zona (ZE).

[0104] En ZE, el medio de separación debería proporcionar un espacio de separación homogéneo en el cual las condiciones de pH y de conductividad eléctrica deberían ser tan constantes como fuera posible y prácticamente viables, debido a que la separación se basa en la diferencia de la densidad de carga neta de las diversas especies de solución.

[0105] En base a la idoneidad explicada anteriormente de los medios de separación para exhibir un pH constante (es decir, un perfil de pH plano) a lo largo de prácticamente todo el espacio de separación, estos medios se denominan medios de separación de ZE, aunque es evidente que tales medios no se limitan estrictamente a aplicaciones de ZE.

[0106] En otras realizaciones, los medios de separación formarán un gradiente de pH durante la electroforesis, en forma de un gradiente lineal o bien en forma de un "gradiente" de pH por etapas (no lineal), en los cuales la diferencia de pH entre el pH más bajo (lado anódico) y el pH más alto (lado catódico) en el medio de separación durante la electroforesis es generalmente más de aproximadamente 0,2 unidades de pH y menos de 3 unidades de pH. Preferentemente, la diferencia de pH está entre 0,5 y 2 unidades de pH, y más preferentemente entre 0,5 y 1,5 unidades de pH. En otras palabras, tales medios de separación forman un gradiente de pH relativamente plano, o incluso ultraplano, durante la electroforesis. Dado que estos medios de separación son particularmente adecuados para las separaciones electroforéticas que operan en modo de isoelectroenfoque (IEF), estos medios se denominan medios de separación de IEF plano (diferencia de pH entre aproximadamente 1,5 y 3 unidades de pH) y de IEF ultraplano (diferencia de pH entre aproximadamente 0,2 y < 1,5 unidades de pH), aunque de nuevo no se debería entender que los términos usados limiten estrictamente estos medios a aplicaciones de IEF.

[0107] Para los medios de separación preferentes (ZE e IEF), el valor de pKa de cada ácido tampón del medio de separación es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 unidades mayor que el pH del medio de separación, y el valor de pKa de cada base tampón es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 unidades menor que el pH del medio de separación.

[0108] En los medios de separación de ZE particularmente preferentes, el valor de pKa de cada ácido tampón es de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,2 unidades mayor, y el valor de pKa de cada base tampón es de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,2 unidades de pH menor, que el pH del medio de separación. Son incluso más preferentes las realizaciones en las cuales los valores de pKa de cada ácido tampón y de cada base tampón están entre 0,4 y 0,9 unidades, o incluso entre 0,6 y 0,9 unidades por encima (ácido tampón) o por debajo (base tampón) del pH del medio de separación.

[0109] Particularmente, aunque no se limitan a los medios de separación de IEF, los criterios de selección para los ácidos tampón y las bases tampón también se pueden definir de forma diferente, no solo porque que en IEF no exista un pH constante del medio de separación. Otro criterio de selección que deben cumplir los ácidos tampón y las bases tampón presentes en el medio de separación se refiere por lo tanto a la diferencia de pKa (ΔpK_a) entre el ácido tampón y la base tampón. Los expertos en la materia comprenderán que se deben obedecer los criterios de selección que hacen referencia al pH del medio de separación, o bien los criterios que se refieren a la diferencia de pKa. En realizaciones preferentes, sin embargo, los ácidos tampón y las bases tampón de los medios de separación deberían cumplir ambos criterios.

[0110] Por lo tanto, en ciertas realizaciones, ΔpK_a entre el ácido tampón y la base tampón en el medio de separación debería estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4 unidades de pK.

[0111] Las diferencias ΔpK_a particularmente preferentes entre el ácido tampón y la base tampón están entre 0,8 y 2,5, y más preferentemente entre 1,0 y 2,0. Se han conseguido resultados muy buenos con medios de separación, específicamente en ZE, cuando ΔpK_a está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 1,8. Para otras aplicaciones, y en particular para aplicaciones de IEF plano, ΔpK_a puede estar entre 2,5 y 4, y está preferentemente entre 2,5 y 3,3.

[0112] En este contexto, se debería observar que los valores de pKa de un ácido o de una base se pueden determinar experimentalmente, aunque el valor de pKa de la mayoría de los compuestos se puede encontrar habitualmente en libros de texto estándar tales como CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, o en recopilaciones de referencia tales como Merck Index. Es importante observar que el valor de pKa de un compuesto determinado depende de la temperatura de la solución. Por lo tanto, a menos que se especifique otra cosa, cualquier referencia a un valor de pKa se referirá a condiciones estándar (solución acuosa a 25 °C), aunque las desviaciones observadas para otra temperatura son habitualmente bastante bajas. La dependencia del pKa de un compuesto determinado con la temperatura también está a menudo tabulada, de modo que la diferencia de pKa se puede calcular fácilmente para

cualquier temperatura determinada.

[0113] Para los medios de separación (sea para aplicaciones de ZE o de IEF), es preferente que las concentraciones relativas de los ácidos tampón y de las bases tampón estén dentro de cierta relación. Así, la relación entre la concentración de todos los ácidos tampón con respecto a todas las bases tampón estaría típicamente entre 9:1 y 1:9. En realizaciones preferentes, la relación es incluso más pequeña, tal como entre 4:1 y 1:4, o entre 7:3 y 3:7, o incluso entre 3:2 y 2:3. La relación más preferente, particularmente en aplicaciones en las cuales se desea un pH constante (por ejemplo, en aplicaciones de ZE), es de aproximadamente 1, es decir, la concentración de la base tampón es prácticamente igual que la concentración de la base tampón. Con respecto a lo expuesto anteriormente, los expertos en la materia entenderán que la concentración exacta de un ácido o de una base determinados puede depender de una diversidad de factores que incluyen la naturaleza de la muestra, la presencia de otros aditivos (véase posteriormente) y el pH deseado del medio de separación y se puede adaptar en consecuencia. Sin embargo, la capacidad amortiguadora y electroforética del medio se perderá en cierta medida cuando se seleccione una concentración demasiado baja de un compuesto (el ácido tampón o bien la base tampón), es decir, fuera de las proporciones enumeradas anteriormente.

[0114] Con respecto a las concentraciones absolutas de los compuestos tampón que se requieren para conseguir separaciones satisfactorias, los expertos en la materia entenderán que puede no existir una regla absoluta, aunque se debería entender que, generalmente, la concentración debería ser lo suficientemente alta para proporcionar la suficiente conductividad eléctrica y capacidad de amortiguación. Los analitos que poseen una alta densidad de carga (superficial) (por ejemplo, péptidos o proteínas) requerirán, como regla general, mayores concentraciones de los compuestos tampón que los analitos que poseen una densidad de carga relativamente baja (por ejemplo, células u orgánulos celulares). De forma similar, para aplicaciones en las cuales el medio de separación exhibe un pH constante (es decir, perfiles de pH planos), se requiere una menor concentración de los compuestos tampón para conseguir la capacidad amortiguadora deseada, mientras que para gradientes de pH (por ejemplo, en aplicaciones de IEF), la concentración debería ser mayor, particularmente en los casos con solo uno o dos ácidos/bases tampón, debido a que la diferencia entre el pH y el pKa del compuesto puede ser mayor conduciendo a una menor ionización (protonación y desprotonación, respectivamente) del compuesto.

[0115] Con los principios anteriores en mente, se contempla que los medios de separación incluyan ácido tampón y base tampón en concentraciones, independientemente entre sí, de al menos aproximadamente 5 mM, aunque en la mayoría de las aplicaciones, las concentraciones son mayores (≥ 10 mM, ≥ 20 mM, o incluso ≥ 30 , ≥ 40 o incluso ≥ 50 mM). Cuando se haga referencia a la concentración del ácido tampón y de la base tampón, respectivamente, se entenderá que las cifras ofrecidas se pretende que se refieran a la concentración total de ácido tampón o de base tampón, respectivamente, en un medio de separación (así como de estabilización) determinado de la presente invención.

[0116] Una característica de los medios de separación proporcionados por la presente invención es que su conductividad eléctrica se selecciona para estar dentro de un cierto intervalo objetivo, es decir, ni demasiado baja para asegurar la suficiente movilidad electroforética de las especies (consiguiendo de ese modo una buena separación en una cantidad limitada de tiempo), ni tampoco demasiado alta para evitar efectos y fenómenos no deseados causados por especies de movimiento rápido dentro del medio de separación. Además, una conductividad eléctrica relativamente baja del medio de separación permite llevar a cabo las separaciones electroforéticas con una elevada intensidad de campo eléctrico sin provocar una sobrecarga térmica (disipación de calor no deseada causada por el proceso electroforético), como se observa con numerosos medios de separación de la técnica anterior.

[0117] Mientras que la conductividad eléctrica absoluta de los medios de separación de la presente invención dependerá de nuevo en cierto modo de la naturaleza de los analitos y del problema de separación específico, los medios de separación deberían tener, como regla general, una conductividad eléctrica entre 30 y 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, aunque la conductividad generalmente no debería exceder de 700, y aún mejor de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Son particularmente preferentes los valores de conductividad entre 50 y 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, más preferentes incluso entre 50 y 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En ciertas situaciones, la conductividad puede estar entre 50 y 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o incluso entre 50 y 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$, aunque también pueden ser aceptables en circunstancias específicas otros valores dentro de los límites más amplios mencionados anteriormente. Los expertos en la materia conocerán bien cómo determinar la conductividad eléctrica de las soluciones, por ejemplo con el equipamiento estándar disponible en el mercado.

[0118] En realizaciones en las cuales se requiere o es deseable la formación de un gradiente de pH entre 0,2 y 3 unidades de pH durante la electroforesis (es decir, para medios de separación de IEF), se entenderá que en realidad el medio de separación consistirá en diversas fracciones separadas que comprenden concentraciones variables del ácido tampón y de la base tampón en el medio para establecer un gradiente de pH preformado. Típicamente, el número de fracciones separadas será al menos 2 y, por razones prácticas, excederá raras veces de aproximadamente 15 fracciones. En realizaciones preferentes, el número de fracciones que tienen diferentes concentraciones o proporciones de concentración de ácido y de base es de 3 a 12, de 4 a 10, de 5 a 9, o incluso de 6 a 8 fracciones. Mientras que el número de subfracciones no se limita técnicamente, en la práctica, el número estará gobernado o al menos influenciado por el número de entradas de medios (E) diferentes del aparato de electroforesis usado para la separación. Tales medios de separación se usan preferentemente en isoelectrofoque de flujo libre (FF-IEF).

[0119] Los tiempos de separación típicos (tiempos de tránsito para los iones en el medio) durante los que se aplica un campo eléctrico varían típicamente de un par de minutos aproximadamente una hora por proceso de separación, aunque también pueden ser posibles separaciones más prolongadas en ciertas condiciones. Preferentemente, el tiempo de tránsito de los iones es de al menos 15 minutos, usando los medios de separación junto con el medio de estabilización. En cualquier caso, los medios de separación pueden, en ciertas condiciones, permitir la separación/fraccionamiento efectivo de analitos incluso en menos de 10 minutos o incluso en menos de 7 o de 5 minutos. En general, las separaciones de ZE e ITP tendrán tiempos de separación más cortos que las separaciones de IEF plano o ultraplano, en las cuales el tiempo de residencia entre los electrodos puede exceder fácilmente de 30, o incluso de 60 minutos.

[0120] Los ácidos tampón adecuados para los fines de la presente invención tienen un pKa entre aproximadamente 3 y aproximadamente 13, aunque es evidente que para separaciones que se llevan a cabo a o cerca de valores de pH típicos para biopartículas (por ejemplo, pH aproximadamente de 6 a 8), los criterios de selección para el ácido tampón requerirán típicamente que el ácido tampón tenga un pKa algo superior al pH del medio de separación (es decir, el pKa estará a menudo entre > 6 y 10 en estos casos). Dado que la mayoría de las aplicaciones electroforéticas se llevan a cabo con analitos de origen biológico, los ácidos tampón se seleccionan preferentemente entre ácidos biológicamente aceptables (o compuestos anfotéricos como se ha explicado anteriormente) que tienen las propiedades de la función de ácido deseadas, es decir, un pKa adecuado. Biológicamente aceptables significa que, en primer lugar, el compuesto amortiguador no es tóxico para el operador o la muestra, y que no conduce a una interacción no deseable con los analitos (por ejemplo una reacción química que cambie la naturaleza o constitución química del analito). Los ácidos tampón biológicamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, compuestos que pertenecen al grupo de los denominados tampón de Good. Los ejemplos específicos de ácidos tampón adecuados incluyen los compuestos conocidos como HIBA, ácido acético, ácido picolínico, PES, MES, ACES, MOPS, MOPSO, HEPES, EPPS, TAPS, taurina, AMPPO, CAPSO, α -alanina, β -alanina, GABA, EACA, 4-hidroxipiridina, 2-hidroxipiridina, y similares.

[0121] Se entenderá que la lista mencionada anteriormente no pretende ser limitante, ya que los expertos en la materia podrán encontrar infinidad de ácidos tampón posibles que posean las propiedades funcionales deseadas y los valores de pKa que se requieren para su inclusión en un medio de separación de la presente invención.

[0122] De forma similar, las bases tampón de la presente invención deberían tener típicamente un pKa entre aproximadamente 1,5 y 12, y se seleccionan preferentemente entre el grupo de bases biológicamente aceptables que tienen las propiedades de la función de base deseadas, es decir, un pKa adecuado. Las bases adecuadas se pueden encontrar entre los tampón de Good, o incluyen, pero no se limitan a, taurina, glicina, ácido 2-aminobutírico, glicilglicina, β -alanina, GABA, EACA, creatinina, piridina-etanol, piridina-propanol, histidina, BISTRIS, morfolinoetanol, trietanolamina, TRIS, amediol, bencilamina, dietilaminoetanol, trialkilaminas, y similares.

[0123] Los medios de separación pueden comprender además uno o más aditivos. Los aditivos son compuestos o iones que no contribuyen (o al menos no significativamente) a la capacidad amortiguadora que proporcionan los ácidos tampón y las bases tampón. Generalmente el número y la concentración de aditivos se debería mantener en un valor mínimo, aunque se entenderá que ciertos analitos o problemas de separación requieran la presencia de compuestos adicionales bien para mantener la integridad del analito o bien para conseguir las propiedades deseadas del medio (por ejemplo, condiciones de desnaturalización).

[0124] Los aditivos posibles seleccionan preferentemente entre los denominados aniones y cationes mono y divalentes "esenciales", potenciadores de la viscosidad, detergentes, agentes de solubilización de proteínas, ligandos de afinidad, agentes reductores y similares.

[0125] Además, en los medios de separación pueden estar presentes otros ácidos o bases, con la condición de que el pKa de su función de ácido o de base esté lo suficientemente alejado del pH o del intervalo de pH del medio de separación para evitar que contribuyan a la capacidad amortiguadora de la solución (aunque por supuesto pueden contribuir a la conductividad eléctrica del medio). Los ejemplos de los ácidos y de las bases posibles incluyen pequeñas cantidades de ácidos o bases fuertes (por ejemplo, NaOH, HCl, etc.) que se disocian completamente en solución, por ejemplo, para el ajuste preciso del pH del medio, o ácidos o bases muy débiles que están presentes en el medio en forma de sus especies prácticamente no disociadas (es decir, que tienen un pKa que está separado más de aproximadamente 4 unidades del pH del medio).

[0126] Los aniones y cationes mono y divalentes esenciales son iones que pueden ser necesarios para mantener la integridad estructural y/o funcional de los analitos de la muestra. Los ejemplos de tales aniones y cationes esenciales incluyen, pero no se limitan a, iones magnesio, iones calcio, iones cinc, iones Fe(II), iones cloruro, iones sulfato, iones fosfato o agentes complejantes tales como EDTA o EGTA, o iones azida (por ejemplo, para evitar la contaminación bacteriana), y similares.

[0127] Los potenciadores de la viscosidad usados habitualmente en los medios de separación pueden incluir polialcoholes tales como glicerol o los diversos PEGs, polímeros hidrofílicos tales como HPMC y similares, hidratos de

carbono tales como sacarosa, ácido hialurónico, y similares. Los potenciadores de la viscosidad pueden ser necesarios para adaptar la viscosidad del medio de separación a la viscosidad de la muestra introducida en el espacio de separación para evitar las turbulencias creadas por las diferencias de densidad o viscosidad entre la muestra y el medio.

5 [0128] Los aditivos adicionales que pueden estar presentes incluyen selectores quirales tales como ciertas dextrinas incluyendo ciclodextrinas, o ligandos de afinidad tales como lectinas y similares. Además, los expertos en la materia conocen numerosos detergentes adecuados, incluyendo SDS, tensioactivos tales como alcoholes grasos, octil glucósido, polisorbatos conocidos como Tween®, y similares. Los ejemplos de agentes de solubilización de proteínas
10 incluyen urea o tiourea, pero también pueden incluir tensioactivos y detergentes.

[0129] En ciertos casos, se puede requerir la adición de agentes reductores para evitar la oxidación de un analito en la solución. Los agentes reductores adecuados que se pueden añadir a la muestra y/o al medio de separación incluyen mercaptoetanol, mercaptopropanol, ditiotreitól (DTT), ácido ascórbico, metabisulfito sódico o potásico, y similares.

15 [0130] En cualquier caso, debido a que muchos de los aditivos mencionados anteriormente tienen carga eléctrica, su concentración se debería mantener tan alta como sea necesaria pero al mismo tiempo tan baja como sea posible de modo que se mantenga la conductividad eléctrica del medio de separación dentro del intervalo (bajo) deseado.

20 [0131] Los ejemplos específicos de medios de separación adecuados, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención (medios de separación tanto de ZE como de IEF (ultra)plano), se describen posteriormente en la sección de Ejemplos.

II. Medios de estabilización

25 II.1. Criterios generales para el diseño de los medios de estabilización

[0133] Se pretende que los medios de estabilización establezcan la composición electroquímica y las condiciones en el medio de separación, para evitar la contaminación cruzada entre el área de separación y los compartimentos de los
30 electrodos en cualquier dirección, y suministren todos los componentes químicos que se requieren en las aplicaciones de FFE. Los medios de estabilización están presentes en la vecindad del ánodo y del cátodo, respectivamente, y residen generalmente entre los respectivos electrodos y el medio de separación.

[0134] Los medios de estabilización se caracterizan generalmente por tener una conductividad eléctrica que es mayor
35 que la conductividad del medio de separación. El concepto de medio de estabilización como se desvela en la presente memoria es aplicable para casi todas las situaciones y disposiciones, y es independiente en gran medida del pH deseado del medio de separación y de la solubilidad de los compuestos tampón, como se explicará con mayor detalle a continuación.

40 [0135] A menos que se indica otra cosa, los siguientes criterios de selección son comunes para todos los medios de estabilización, independientemente del modo de operación de la separación electroforética (es decir, ZE, IEF o ITP).

A) Medios de estabilización catódicos

45 [0136] Los medios de estabilización catódicos (CSM) están presentes en la vecindad del cátodo del aparato de electroforesis, o, alternativamente, al menos contiguos al lado catódico del medio de separación y comprenden al menos un ácido tampón, y al menos una base fuerte. El significado de un ácido tampón ya se ha explicado en la sección relativa a los medios de separación, y se aplica igualmente para el ácido o ácidos tampón de los medios de estabilización. Una base fuerte, como se usa el presente contexto, se pretende que incluya una base que es capaz de desprotonar
50 considerablemente el ácido tampón del medio de estabilización, aumentando de ese modo la ionización en el CSM. Preferentemente, básicamente el 100% de la base fuerte está presente en forma protonada (o suministran iones OH⁻ directamente a la solución acuosa) a cualquier pH determinado del medio de separación. Por lo tanto, las bases fuertes tienen un pKa alto, a menudo mayor de 13, y a veces incluso mayor.

55 [0137] La concentración de la base fuerte se debería seleccionar de modo que sea suficiente para conseguir al menos una desprotonación considerable de todos los ácidos (incluyendo el ácido tampón) del CSM. Una desprotonación considerable significa que al menos más de aproximadamente un 30%, y preferentemente más de aproximadamente un 50, 60, 70, 80 o incluso un 90% del ácido tampón está presente en forma desprotonada, es decir, en forma de la base conjugada del ácido tampón usado en el CSM. En otras palabras, la adición de la base fuerte aumenta la concentración
60 de especies ionizadas en el CSM, lo que conduce a un aumento de la conductividad eléctrica en comparación con la situación en que no se añade la base fuerte.

[0138] Por otra parte, cualquier exceso de base fuerte no amortiguado por el ácido tampón conducirá sencillamente a un aumento no deseado del pH en el medio de estabilización. Por lo tanto, se entenderá que la concentración de la base
65 fuerte debería ser igual en el mejor de los casos, pero es preferentemente menor, que la concentración de todos los

ácidos tampón (si hubiera presente más de uno) en el CSM. En vista de la presencia de una base fuerte, los expertos en la materia entenderán que el pH del CSM es normalmente mayor que el pH del medio de separación, independientemente de que la separación electroforética se opere en modo ZE, IEF o ITP. Sin embargo, debido a los efectos no deseados que se observan cuando se producen grandes cambios de pH en el límite entre el medio de estabilización y el medio de separación, la diferencia de pH entre el CSM y el medio de separación no debería ser mayor de aproximadamente 3, y preferentemente no debería ser mayor de aproximadamente 2 o incluso 1 unidad de pH. Lo más preferentemente, el cambio de pH debería ser tan bajo como fuera posible, particularmente para FF-ZE.

[0139] Los expertos en la materia serán conscientes de que, habitualmente, el pH a lo largo de toda el área de estabilización entre el cátodo y el medio de separación no puede permanecer constante, debido a la afluencia de iones hidroxilo generados por el cátodo durante la electroforesis. El deseo mencionado anteriormente de una diferencia de pH baja entre el CSM y el medio de separación se refiere por lo tanto al pH en el CSM cerca del límite con el medio de separación. De hecho, que el pH se pueda mantener constante más cerca del cátodo normalmente no es particularmente relevante debido a que la barrera de alta conductividad creada por el CSM sirve entre otras cosas para evitar que los analitos entren en el CSM.

[0140] Los medios de estabilización catódicos pueden comprender adicionalmente al menos una base tampón, en los cuales la base tampón tiene el mismo significado que se ha explicado anteriormente para los medios de separación, con la condición de que la concentración de todos los ácidos usados en el CSM sea mayor que la concentración de todas las bases. En otras palabras, la suma de las concentraciones molares de los ácidos (tampón) en estas realizaciones debe ser mayor que la suma de las concentraciones molares de las bases (bases tampón + base fuerte), es decir, el CSM debería tener una relación de concentración al menos > 1 (todos los ácidos frente a todas las bases). Por razones prácticas, una relación de concentración > 50 será raras veces necesaria o deseable. En realizaciones preferentes en las cuales está presente una o más de una base tampón, la relación de concentración (ácidos/bases) en el CSM está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, y más preferentemente está entre 3 y 8, o incluso entre 4 y 6, aunque puede ser posible cualquier relación de concentración entre aproximadamente 1,1 y 50 en un CSM adecuado.

[0141] En principio, el ácido o ácidos tampón usados para el CSM pueden ser iguales o pueden ser diferentes al ácido o ácidos tampón usados en el medio de separación. En los casos en los cuales se seleccione un ácido tampón diferente, la movilidad electroforética del ácido tampón (diferente) del CSM sería preferentemente, pero no necesariamente, similar o al menos cercana a la movilidad electroforética del ácido tampón del medio de separación. La movilidad electroforética (EM), como se usa en la presente memoria, significa la tasa de migración de aniones y cationes en un campo eléctrico con una intensidad de campo determinada por unidad de tiempo en un medio acuoso. La movilidad electroforética se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$u = s / H \times t$$

en la cual s representa la distancia de migración (metros), H representa la intensidad del campo eléctrico (V/m) y t representa el tiempo (segundos). Además, el pK_a del ácido tampón debería ser asimismo similar o al menos cercano al pK_a del ácido tampón del medio de separación. Los expertos en la materia entenderán que este criterio es particularmente importante para aplicaciones de ZE, pero en realidad no es aplicable a separaciones de ITP (anódicos), en las cuales se deberían aplicar otros criterios para la selección del ácido tampón del CSM como se explica posteriormente con mayor detalle.

[0142] Otro criterio que deberían cumplir preferentemente los ácidos tampón del CSM es que el pK_a de cada ácido tampón del CSM debería ser igual en el mejor de los casos (específicamente en ZE), y en caso contrario ser mayor que el pK_a de cada ácido tampón del medio de separación. En otras palabras, el ácido tampón debería ser idéntico al ácido tampón del medio de separación, o bien ligeramente más débil en el caso de ser un ácido tampón diferente.

[0143] Con respecto a los criterios de selección que se refieren a la identidad y a las propiedades de los ácidos tampón del CSM, particularmente en los casos en los cuales está presente más de un ácido tampón, los expertos en la materia entenderán que dependen del modo de operación destinado. Por lo tanto, los criterios de selección adecuados para los medios de estabilización preferentes para ZE, IEF e ITP, respectivamente, se describirán para cada modo de operación en la siguiente sección.

[0144] En cualquier caso, para los medios de estabilización preferentes usados en aplicaciones de ZE e IEF (es decir, no aplicables para aplicaciones de ITP), la concentración total de todos los ácidos del CSM será mayor que la concentración de todos los ácidos tampón del medio de separación. Preferentemente, la relación de concentración (CSM con respecto al medio de separación) estará entre 1,1 y 50, mientras que las proporciones de concentración particularmente preferentes están entre 1,5 y 30. Son incluso más preferentes las proporciones entre 2 y 20, y las más preferentes están entre 5 y 15, aunque las proporciones de concentración entre 3 y 7 o entre 5 y 10 también pueden obtener resultados satisfactorios para numerosos problemas de separación.

[0145] Las concentraciones absolutas de todos los ácidos tampón del CSM en conjunto pueden variar ampliamente y dependen del problema de separación particular, la naturaleza de los analitos, y la composición del medio de

separación. Sin embargo, las concentraciones típicas para los ácidos tampón del medio de separación son más de aproximadamente 20 mM, aunque frecuentemente la concentración será algo mayor, tal como más de 50 mM, más de 75 mM, más de 100 mM, más de 150 mM, o incluso más de 200 mM. El límite natural para la concentración superior estará impuesto, por supuesto, por la solubilidad de los respectivos compuestos tampón. Por ejemplo, la histidina es generalmente un buen compuesto amortiguador y muy adecuado para su uso en separaciones electroforéticas, pero su utilidad puede estar limitada en ocasiones por una solubilidad relativamente baja.

[0146] Las concentraciones absolutas de todas las bases tampón (si estuvieran presentes) del CSM en conjunto pueden variar de nuevo ampliamente y dependen del problema de separación particular, la naturaleza de los analitos, y la composición del medio de separación. Sin embargo, las concentraciones típicas para las bases tampón del medio de separación son más de aproximadamente 10 mM, aunque frecuentemente la concentración será algo mayor, tal como más de 20 mM, más de 30 mM, más de 50 mM, más de 100 mM, o en ocasiones incluso más de 200 mM, con la condición de que la concentración total de todas las bases del CSM sea menor que la concentración de los ácidos (tampón) como se ha explicado anteriormente.

15 B) Medios de estabilización anódicos

[0147] Los medios de estabilización anódicos (ASM) se seleccionan básicamente según criterios idénticos a los que se han descrito para los medios de estabilización catódicos (CSM), excepto en que para los ASM, los términos ácido y base se tendrán que intercambiar cuando se comparen con el CSM.

[0148] Por lo tanto, los ASM deben comprender al menos una base tampón y un ácido fuerte, en los cuales el último sirve preferentemente para conseguir una protonación considerable de todas las bases en el ASM. Por lo tanto, el pH del ASM será habitualmente menor que el pH del medio de separación y los valores de pKa de las bases tampón del ASM deberían ser iguales o menores que los valores de pKa de las bases tampón del medio de separación (es decir, debería estar presente una base igual o más débil en el ASM).

[0149] Como en el caso de los CSM, los ASM pueden comprender además al menos un ácido tampón, con la condición de que la concentración de todas las bases (tampón) debería ser mayor que la concentración de todos los ácidos del ASM.

[0150] La realizaciones preferentes ya se han discutido en relación con el CSM y se aplican igualmente a los ASM, de nuevo con la condición de que los términos ácido y base se intercambian y que una base más débil se caracteriza por un valor de pKa menor (mientras que un ácido más débil se caracteriza por un valor de pKa mayor).

[0151] Además, los ácidos tampón y los ácidos tampón adecuados para los medios de estabilización anódico y catódico se seleccionan generalmente entre los mismos ácidos tampón y bases tampón que se han descrito para los medios de separación.

[0152] Los expertos en la materia conocerán los ácidos fuertes y las bases fuertes adecuados que se pueden usar para los medios de estabilización. Los ácidos fuertes se pueden seleccionar entre cualquier ácido que libere prácticamente todos los protones, protonando de esa manera las bases tampón del ASM, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares. Las bases fuertes se pueden seleccionar entre cualquier base que está presente principalmente en su forma de ácido conjugado o contribuye directamente con iones hidroxilo (OH⁻) al CSM, y además es capaz de desprotonar el ácido tampón en gran medida, por ejemplo, hidróxidos de metales alcalinos tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, etc., o hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como hidróxido de magnesio o hidróxido de calcio, y similares.

[0153] Generalmente, la base fuerte debería tener un pKa de al menos 12 y el ácido fuerte debería tener un pKa menor de aproximadamente 1,5 para ser útiles, aunque los expertos en la materia entenderán que el principio subyacente es una diferencia suficientemente grande en la acidez/basicidad en comparación con las bases tampón y los ácidos tampón del medio de estabilización de modo que la base fuerte o el ácido fuerte sean capaces de ionizar el correspondiente ácido tampón/base tampón como se ha explicado anteriormente. Por lo tanto, un ácido fuerte es un ácido que tiene un pKa que es al menos aproximadamente 3 unidades de pK menor que el pKa de cualquier base tampón del ASM. Asimismo, una base fuerte es cualquier base que tiene un pKa al menos 3 unidades de pK mayor que el pKa de los ácidos tampón del CSM.

[0154] Los medios de estabilización también comprenden uno o más de un aditivo. Los aditivos se seleccionan según los mismos criterios que se han perfilado para los medios de separación. De hecho, dado que los aditivos se requieren habitualmente para mantener la estabilidad de la muestra/analito, es común, pero no necesario, que los aditivos sean los mismos que están presentes en el medio de separación. Con respecto a la mayor concentración de los ácidos/bases tampón del medio de estabilización, la concentración de los aditivos iónicos asimismo es habitualmente mayor en comparación con la concentración de los aditivos del medio de separación. La concentración de los potenciadores de la viscosidad tales como glicerol o sacarosa, sin embargo, se adaptará preferentemente para conseguir una viscosidad y densidad similares del medio de estabilización y del medio de separación, respectivamente.

[0155] Una característica fundamental de los medios de estabilización es que la conductividad eléctrica debe ser mayor, y preferentemente mucho mayor que la conductividad del medio de separación. Así, en realizaciones preferentes, la conductividad del ASM y del CSM, independientemente la una de la otra, será mayor con respecto a la conductividad del medio de separación en un factor de al menos aproximadamente 2, aunque es incluso más preferente que la conductividad sea mayor en un factor de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces con respecto a la conductividad del medio de separación. En realizaciones particularmente preferentes, la conductividad eléctrica de los medios de estabilización es al menos más de 10 veces mayor que la conductividad del medio de separación.

[0156] Los valores absolutos de conductividad para los medios de estabilización son por lo tanto preferentemente superiores a aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, aunque en la mayoría de las situaciones, la conductividad será al menos 1000, 1500, 2000, 3000 o incluso 5000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. En ciertas circunstancias, particularmente con una conductividad relativamente alta del medio de separación, se pueden conseguir buenos resultados cuando los medios de estabilización tienen valores de conductividad superiores a 10.000, o incluso superiores a 20.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

[0157] Se debería entender que la conductividad del medio de estabilización anódico no necesita ser la misma que la del medio de estabilización catódico, aunque estarán típicamente en un intervalo similar. En cualquier caso, el valor real de conductividad dependerá normalmente de la situación de separación específica y puede variar entre el ASM y el CSM, con la condición de que el medio de estabilización se diseñe de modo que mantenga una barrera de conductividad estable con el medio de separación.

[0159] Mientras que los criterios de selección generales mencionados anteriormente para el diseño de medios de estabilización adecuados según la presente invención son aplicables a prácticamente todos los modos de operación, y particularmente a aplicaciones de ZE e IEF, las siguientes secciones describen ciertas realizaciones preferentes que se adaptan específicamente a los modos de operación electroforéticos (ZE, IEF e ITP, respectivamente).

II.2. Medios de estabilización para electroforesis de zona

[0160] Una característica de las separaciones electroforéticas operadas en modo de electroforesis de zona es que el pH del medio de separación debería ser prácticamente constante para conseguir una separación de las partículas en base a la diferente densidad de carga neta de las partículas de la solución. Los expertos en la materia entenderán que la densidad de carga superficial neta real dependerá del pH que rodea a cada partícula. Así, un pH constante en el medio de separación sirve para mantener la densidad de carga neta distinta de una partícula. Sin embargo, las separaciones de ZE llevadas a cabo sin estabilización encontrarán frecuentemente inestabilidades de pH, particularmente en la región más cercana a los electrodos, disminuyendo de ese modo la efectividad de la separación debido al cambio en la densidad de carga neta de los analitos presentes en esa región. Por lo tanto, un medio de estabilización adecuado para aplicaciones de ZE mantendrá el pH tanto como sea posible mientras que exhibe una alta conductividad que crea una barrera de conductividad que evita que los analitos pasen por los electrodos. Por lo tanto, en electroforesis de zona, la diferencia de pH entre el medio de estabilización y el medio de separación es menos de 1,5, preferentemente menos de 1,2, más preferentemente menos de 1,0, de forma particularmente preferente menos de 0,8 y lo más preferentemente menos de 0,6 unidades de pH.

[0161] Dado que los medios de separación descritos, que comprenden un ácido tampón y una base tampón, son altamente adecuados para aplicaciones de ZE, se entenderá que los medios de estabilización de ZE adecuados se pueden definir por referencia a tales medios de separación. Por lo tanto, los medios de estabilización de ZE preferentes comprenderán al menos un ácido tampón que sea idéntico al ácido tampón del medio de separación (CSM), o al menos una base tampón que sea idéntica a la base tampón del medio de separación (ASM). Alternativamente, el ácido tampón del medio de separación catódico o la base tampón del medio de separación anódico deberían tener un valor de pKa similar y una movilidad electroforética similar que el ácido/base respectivo del medio de separación. Similar en este con texto significa que el valor de pKa no debería diferir más de aproximadamente 0,5, y preferentemente no debería diferir más de aproximadamente 0,3 o incluso 0,1 unidades de pK. De forma similar, la movilidad electroforética no debería diferir en más de un 30%, y preferentemente debería diferir menos de aproximadamente un 20 o incluso un 10%.

[0162] En los casos en los cuales exista más de un ácido tampón (CSM) o de una base tampón (ASM) presente en el medio, los ácidos/bases tampón adicionales serían preferentemente más débiles (es decir, ácidos que tengan un mayor pKa y bases que tengan un menor pKa) que el ácido/base amortiguador que también está presente en el medio de separación. Para realizaciones particulares, la concentración de los ácidos o de las bases más débiles en el medio de estabilización sería menor, y preferentemente en mucho menor (por ejemplo, en un factor de al menos 2, 3, 4, 5 o incluso 10) que la concentración del ácido/base amortiguador que es idéntico al empleado en el medio de separación.

[0163] Dado que las concentraciones de amortiguador en el medio de separación de ZE son típicamente bastante bajas (debido a que los compuestos tampón se pueden seleccionar para que su capacidad amortiguadora sea óptima a un pH determinado), se entenderá que las concentraciones absolutas de los ácidos tampón (CSM) y de las bases tampón (ASM) en el medio de estabilización de ZE serán normalmente más bajas en comparación con la concentración que se requiere para las aplicaciones de IEF.

[0164] Se han conseguido resultados particularmente buenos con medios de estabilización de ZE que comprenden un solo ácido tampón (CSM) o una sola base tampón (ASM), aunque otros medios de estabilización de ZE preferentes pueden comprender un ácido tampón (CSM) o una base tampón adicional más débil, aunque a una concentración menor como se ha explicado anteriormente.

[0165] Además, los medios de estabilización también pueden comprender bases tampón (CSM) o ácidos tampón (ASM), con la condición de que su concentración, junto con la concentración del ácido fuerte/base fuerte, no exceda la concentración total de todos los ácidos tampón (CSM) o de todas las bases tampón (ASM) en el medio de estabilización de ZE como se ha explicado anteriormente con mayor detalle.

[0166] En cualquier caso, la selección de los ácidos tampón/bases tampón del CSM y del ASM, respectivamente, debería estar gobernada por el objetivo de mantener un perfil de pH prácticamente plano en el medio de separación. Los medios de estabilización como se han definido anteriormente son muy útiles en FF-ZE.

15 *II.3. Medios de estabilización para isoelectroenfoque*

[0167] En las separaciones electroforéticas operadas en modo de isoelectroenfoque, la separación de las diferentes partículas o especies de la muestra se basa en su diferente valor de pI, siendo dicho valor de pI equivalente al valor de pH del medio de separación no homogéneo circundante frente al que las partículas/especies parecen eléctricamente neutras. Por lo tanto, una separación de IEF se llevará a cabo en presencia de un gradiente de pH, que puede ser lineal, pero también puede ser discontinuo (es decir, por etapas). Se conocen en la técnica medios de separación de IEF que proporcionan un amplio gradiente de pH (por ejemplo, Servalyt®, o Prolytes®, como se han mencionado anteriormente en la presente memoria). El gradiente de pH de un medio de separación de IEF se debería seleccionar preferentemente para incluir al menos los valores de pI de los analitos de interés. Por ejemplo, para analitos que tienen un pI entre 6,5 y 8 (por ejemplo, proteínas), el gradiente de pH en el medio de separación de IEF debería variar idealmente de al menos aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 8,5 para conseguir resultados óptimos.

[0168] Los medios de separación se caracterizan generalmente por el pequeño número de ingredientes requeridos, y son particularmente adecuados para gradientes de pH planos o incluso ultraplanos (es decir, diferencias de pH de menos de 3 unidades de pH). Los medios de separación según la presente invención comprenden un ácido tampón y una base tampón.

[0169] Los medios de estabilización de IEF descritos en la presente memoria son útiles y adecuados para la estabilización de las condiciones de todos los medios de separación de IEF, incluyendo los medios de separación para gradientes de pH planos y ultraplanos. En ciertas realizaciones, los medios de estabilización de IEF se diseñan según los siguientes criterios de selección. Manteniendo los principios generales de los medios de separación de IEF en mente, los siguientes criterios se aplican particularmente para el diseño de los medios de estabilización de IEF adecuados de la presente invención.

[0170] Por lo tanto, para los medios de estabilización de IEF, el pKa del ácido tampón del CSM debería ser mayor que el valor de pI del analito más básico de la muestra (es decir, el analito que tiene el mayor pI). De forma similar, el pKa de la base tampón del ASM debería ser menor que el pI del analito más ácido de la muestra.

[0171] Los medios de estabilización de IEF adecuados se pueden diseñar con solo un ácido tampón (CSM) o solo una base tampón (ASM), particularmente para gradientes de pH planos y ultraplanos, aunque se contempla que los medios de estabilización de IEF también pueden comprender más de un ácido tampón (CSM) y de una base tampón (ASM), respectivamente. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes dos, y en ocasiones incluso tres o más compuestos tampón en el CSM y en el ASM, respectivamente.

[0172] El pKa de cada ácido tampón del CSM debería estar dentro del intervalo $(pI + 0,3) < pKa < (pI + 3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pI + 0,5) < pKa < (pI + 2)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pI + 0,5) < pKa < (pI + 1,3)$. De forma similar, el pKa de cada base tampón del ASM debería estar dentro del intervalo $(pI - 3) < pKa < (pI - 0,3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pI - 2) < pKa < (pI - 0,5)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pI - 1,3) < pKa < (pI - 0,5)$.

[0173] Alternativamente, los valores de pKa de los ácidos tampón del CSM y de las bases tampón del ASM también se pueden definir con respecto al intervalo de pH (es decir, pH mínimo y pH máximo) del medio de separación de IEF. La definición en base al intervalo de pH del medio de separación de IEF puede ser alternativa a la que se refiere al pI de los analitos, o dicho requisito puede ser aditivo. Por lo tanto, el valor de pKa de cada uno de los ácidos tampón del CSM será mayor que el valor de pH máximo del medio de separación de IEF. Asimismo, el valor de pKa de cada una de las bases tampón del ASM será menor que el valor de pH mínimo del medio de separación de IEF.

[0174] En realizaciones particulares, el valor de pKa de cada ácido tampón del CSM está en el intervalo de $(pH_{max} + 0,3) < pKa < (pH_{max} + 3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pH_{max} + 0,5) < pKa < (pH_{max} + 2)$, y lo más preferentemente

dentro del intervalo $(pH_{\max} + 0,5) < pKa < (pH_{\max} + 1,3)$, y el valor de pKa de cada base tampón del ASM está en el intervalo de $(pH_{\min} - 3) < pKa < (pH_{\min} - 0,3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pH_{\min} - 2) < pKa < (pH_{\min} - 0,5)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pH_{\min} - 1,3) < pKa < (pH_{\min} - 0,5)$.

5 **[0175]** Si está presente más de un ácido tampón (CSM) o de una base tampón (ASM), los compuestos tampón adicionales se deberían seleccionar para tener valores de pKa diferentes dentro del intervalo prescrito anteriormente. En realizaciones preferentes, la concentración de los ácidos tampón más débiles del CSM y de las bases tampón más débiles del ASM debería ser mayor que la concentración de los respectivos ácido tampón (CSM) y base tampón (ASM) más fuertes, es decir, del ácido tampón que tiene un pKa más cercano al pI del analito más básico para el CSM, y de la base tampón que tiene un pKa más cercano al pI del analito más ácido para el ASM, respectivamente.

[0176] Mayor concentración en este sentido significa que la concentración de los ácidos y de las bases más débiles es mayor en un factor de al menos 1,1, y preferentemente al menos aproximadamente 2, más preferentemente aproximadamente 3, y en ocasiones en un factor de aproximadamente 4, 5 o incluso 10 mayor con respecto a la concentración del ácido/base tampón más fuerte del CSM y del ASM, respectivamente.

[0177] Además, los medios de estabilización de IEF también pueden comprender una o más bases tampón (CSM) y ácidos tampón (ASM), con la condición de que la concentración combinada de toda las bases del CSM sea menor que la concentración total de los respectivos ácidos tampón, y que la concentración de todos los ácidos del ASM sea menor que la concentración total de las respectivas bases tampón, respectivamente.

[0178] El pH del CSM será normalmente mayor que el pH máximo (el punto extremo del gradiente de pH hacia el cátodo) del medio de separación. Preferentemente, el pH del CSM no debería ser más de aproximadamente 3, y más preferentemente no más de aproximadamente 2 unidades de pH mayor que el pH máximo del medio de separación de IEF. Específicamente para los gradientes de pH ultraplano, es particularmente preferente que la diferencia de pH se mantenga en un valor mínimo, es decir, el pH solamente puede ser 1,5 unidades de pH o solamente 1 unidad de pH mayor que el pH máximo del medio de separación de IEF. Asimismo, el pH del ASM no debería ser inferior a aproximadamente 3, y más preferentemente no inferior a aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pH mínimo del medio de separación de IEF. Para gradientes de pH ultraplano, es particularmente preferente que la diferencia de pH se mantenga en un valor mínimo, es decir, el pH solamente puede ser 1,5 unidades de pH o solamente 1 unidad de pH menor que el pH mínimo del medio de separación de IEF.

[0179] Es preferente que el valor de la diferencia de pH entre un medio de estabilización y el medio de separación contiguo al medio de estabilización sea al menos de aproximadamente 0,6 unidades de pH, preferentemente al menos aproximadamente 0,8 unidades de pH y lo más preferentemente al menos aproximadamente 1 unidad de pH. Siguiendo los principios para las diferencias de pH entre el CSM y el ASM, respectivamente, y un medio de separación como se ha perfilado anteriormente, el valor de pH del CSM será mayor que el valor de pH máximo del medio de separación y el valor de pH del ASM será menor que el valor de pH mínimo del medio de separación.

[0180] Los expertos en la materia entenderán que los valores de pH observados en los medios de estabilización pueden no ser constantes en todo el intervalo (particularmente cuando se aproximan a los electrodos), de modo que cualquier referencia al pH de los medios de estabilización se debería entender como el pH en o cerca del límite entre el medio de estabilización y el medio de separación. Además, se entenderá que la identidad de los compuestos tampón de los medios de estabilización tendrá influencia sobre las condiciones de pH en el medio de separación. De hecho, la selección de los ingredientes y de su concentración determinará el gradiente de pH que se consigue cuando se aplica un campo eléctrico durante la electroforesis. Por lo tanto, se entenderá que la referencia a los valores de pH se referirá generalmente al pH en condiciones de equilibrio (es decir, después de que se haya formado el gradiente), y en ciertas circunstancias puede incluso desviarse de los valores preferentes que se han descrito anteriormente.

50 *II.4. Medios de estabilización para isotacoforesis*

[0181] Las técnicas de separación de isotacoforesis (ITP) de solución libre o de flujo libre utilizan las diferencias en el valor de la movilidad electroforética (EM) de las partículas para conseguir un procedimiento de separación electroforética. A diferencia de la electroforesis de zona de flujo libre, la separación se consigue en un medio no homogéneo, y a menudo proporciona una mejor disolución debido al "efecto de enfoque" inherente al modo de operación. De hecho, cuando las partículas individuales se difunden desde una banda separada de partículas (por ejemplo, proteínas) durante la ITP, estas partículas entran en un medio con una intensidad de campo eléctrico variable, dando como resultado que las partículas aceleran o deceleran localmente generalmente hacia uno de los electrodos múltiples. El efecto de enfoque inherente significa que las partículas que se mueven más lentas o más rápidas encuentran la manera de volver de nuevo a la fracción dominante. Las partículas con una movilidad electroforética conocida se pueden aislar dentro de un campo migratorio mediante la adición de espaciadores con movilidades electroforéticas ligeramente mayores y ligeramente menores que la partícula de interés. Esto se denomina generalmente "apilamiento" en el cual se utilizan "espaciadores" para aislar la partícula o partículas con movilidad electroforética conocida y distinta. Un ejemplo de los fundamentos de la isotacoforesis se muestra en la patente US 65 3.705.845, titulada "Method in Counterflow Isotachophoresis".

- [0182] Como se ha mencionado anteriormente de forma breve, la ITP difiere de la electroforesis de zona o del isoelectroenfoque estándar en el uso de un sistema de electrolito discontinuo. Este sistema de electrolito discontinuo se compone típicamente de un electrolito o medio líder y uno terminador, en el cual las especies cargadas en estos medios exhiben una movilidad electroforética efectiva más rápida (líder) y más lenta (terminador) que las especies o analitos iónicos contenidos en la muestra mezclada. En otras palabras, las especies cargadas de la muestra se desplazarán hacia el electrodo respectivo "envueltas" o "protegidas" por los iones líder que se mueven más rápido y los iones terminador que se mueven más lento.
- 10 [0183] En la práctica, la muestra que se va a separar se introduce normalmente entre el medio líder y el terminador, en sí misma o a veces junto con otros compuestos/iones que exhiben una movilidad electroforética que se encuentra entre la movilidad del terminador y la del líder (es decir, más lentos que el líder y más rápidos que el terminador). Tales medios adicionales que tienen una movilidad intermedia se denominan en ocasiones medios espaciadores o electrolitos espaciadores.
- 15 [0184] Mientras se someten a un campo eléctrico, las especies cargadas comenzarán a moverse hacia el electrodo que tiene la carga opuesta pero con velocidades variables que corresponden a su movilidad electroforética individual. En otras palabras, la mezcla de analitos de la muestra se separará en zonas puras de especies individuales de acuerdo con su movilidad electroforética. Suponiendo que exista una capacidad de amortiguación suficiente, después de la separación completa se consigue una migración de estado estacionario. Además, dependiendo de las otras partes de la muestra mezclada, los "espaciadores" de la muestra mezclada causan un estado caracterizado como "apilamiento" en las zonas adyacentes. Cada zona "apilada" comprende por lo tanto solamente una sustancia de igual o similar movilidad electroforética. La zona o zonas que comprende la muestra mezclada migran en el mismo orden de movilidad decreciente pero no obstante con la misma velocidad de movimiento con respecto al electrodo.
- 20 [0185] El estado estacionario de isotacoforesis tiene una característica especial de concentración en cada zona de muestra, en el cual la concentración de la zona de muestra es directamente proporcional a la concentración de la zona que la encabeza (líder). Específicamente, las características de concentración y las movilidades de los iones migratorios en isotacoforesis se interrelacionan mediante la ecuación de Kohlrausch, que es conocida por los expertos en la materia.
- 25 [0186] La isotacoforesis se ha usado tradicionalmente en electroforesis capilar, pero más recientemente, se han desarrollado separaciones satisfactorias empleando dispositivos de electroforesis de flujo libre, tales como el Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™. Por ejemplo, se ha descrito recientemente una separación preparativa de orgánulos en los documentos intermediarios WO 2008/053047 y WO 2008/025806.
- 30 [0187] De forma similar a las aplicaciones de electroforesis llevadas a cabo en otros modos de operación (por ejemplo, ZE e IEF), las separaciones de ITP a menudo encuentran no obstante problemas de estabilidad, particularmente, pero no exclusivamente, cuando se llevan a cabo como técnica de electroforesis de deflexión de flujo libre preparativa o analítica. El nuevo concepto de los medios de estabilización de ITP descritos en la presente memoria soluciona los problemas de estabilidad observados en la técnica y asegura condiciones de separación electroforética estables, reproducibles y precisas, en particular un perfil de intensidad de campo eléctrico reproducible en un tiempo determinado durante la electroforesis.
- 35 [0188] Debido a las peculiaridades del modo de operación de ITP que se han descrito anteriormente, los expertos en la materia entenderán que en principio existen cuatro medios de estabilización distintos que es necesario considerar. En primer lugar, los analitos de interés pueden tener carga positiva o negativa y por lo tanto se desplazarán hacia el ánodo y el cátodo, respectivamente.
- 40 [0189] Por lo tanto, se puede hacer la distinción entre separaciones de ITP aniónica, en las cuales las especies de interés con carga negativa (es decir, aniones) se desplazan hacia el ánodo, y separaciones de ITP catiónica, en las cuales las especies de interés con carga positiva se desplazan hacia el cátodo. En cada caso, existirá un medio de estabilización en la vecindad del ánodo y del cátodo, respectivamente. Así, en la ITP aniónica, existirá un medio de estabilización anódico que comprende las especies de movimiento más rápido (es decir, el ion "líder"), y un medio de estabilización catódico que debe comprender las especies de movimiento más lento (es decir, el ion "terminador"). Por el contrario, las separaciones de ITP catiónica tendrán un medio de estabilización anódico que comprende el terminador y un medio de estabilización catódico que comprende el ion líder.
- 45 [0190] Los criterios de selección para los ingredientes de los cuatro medios de estabilización de ITP diferentes mencionados anteriormente se describirán a continuación.
- 50
- 55
- 60

I. Separación de ITP aniónica

I.A *Medio de estabilización catódico*

[0191] Un medio de estabilización catódico de ITP para ITP aniónica comprende un compuesto "terminador", es decir, un compuesto ionizable en el cual la forma aniónica del compuesto tiene la movilidad electroforética efectiva más lenta hacia el ánodo durante la electroforesis, y además comprende al menos una base fuerte.

5 **[0192]** Según el uso de los términos de la técnica (como se ha descrito anteriormente), el "terminador" en las aplicaciones de ITP aniónica es la especie aniónica que tiene la movilidad electroforética más lenta en la cámara de electroforesis. Dado que la movilidad electroforética también depende del grado de ionización, se entenderá que un compuesto terminador puede referirse a una forma iónica de un compuesto (por ejemplo, la sal de un ácido débil), o bien al propio ácido sin carga, que puede llegar a desprotonarse, y así ionizarse hasta cierto grado (dependiendo del pH del medio circundante).

[0193] Por lo tanto, el terminador es un ácido tampón según las definiciones presentadas anteriormente en la presente memoria. Dado que el grado de ionización en la ITP dependerá del contraion presente en la cámara de separación (típicamente una base tampón como contraion de los iones de movimiento más rápido en el medio líder), el ácido tampón se debería seleccionar preferentemente con respecto al valor de pKa de la base tampón del medio de estabilización líder. Así, el pKa del ácido tampón del medio de estabilización catódico de ITP debería ser preferentemente mayor que el pKa de la base tampón del medio líder. En realizaciones particularmente preferentes, la diferencia de pKa entre el ácido tampón y la base tampón del líder debería estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3,5, más preferentemente entre 1 y 3, y lo más preferentemente entre 1,5 y 2,5, siendo por supuesto el pKa del ácido tampón mayor que el pKa de la base tampón.

[0194] Para evitar grandes e innecesarios cambios de pH, la concentración del compuesto terminador debería ser mayor que la concentración de la al menos una base fuerte. Las proporciones de concentración dependerán habitualmente del problema de separación específico, pero estarán habitualmente entre 1,5:1 y 5:1 (terminador:base fuerte), pero también pueden estar entre 2:1 y 3:1, aunque también son posibles otras proporciones.

[0195] Las concentraciones absolutas adecuadas del compuesto terminador están habitualmente entre aproximadamente 10 mM en el extremo inferior y aproximadamente 500 mM en el extremo superior aunque, en la práctica, la solubilidad de un compuesto terminador determinado puede determinar el límite superior de concentración. En algunas realizaciones preferentes, la concentración absoluta del compuesto terminador está a menudo entre aproximadamente 30 y 300, y más preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 mM.

[0196] En base a las proporciones de concentración mencionadas anteriormente entre el terminador y el ácido fuerte, las concentraciones posibles de la base fuerte son por lo tanto algo menores que las descritas para el terminador. Así, las concentraciones adecuadas de la base fuerte pueden variar de menos de 10 mM a aproximadamente 400 mM, mientras que son ciertamente más preferentes las concentraciones en el intervalo de 50 a 200 mM. Una base fuerte en el contexto de las aplicaciones de ITP aniónica se debería entender que incluye bases cuyo valor de pKa es al menos dos, y preferentemente 3 o incluso 4 unidades de pK mayor que el pKa del ácido tampón. Muy a menudo, las bases fuertes tales como hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos (KOH, NaOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, etc.) son adecuadas como base fuerte, aunque también se pueden emplear otras bases (débiles) con la condición de que sean capaces de desprotonar considerablemente el ácido tampón (terminador) para conducir a la alta conductividad deseada.

[0197] Además, mientras que en principio se usa más de una base fuerte, el deseo de mantener el número de especies diferentes en la cámara de separación tan bajo como sea posible hará que los expertos en la materia normalmente empleen solamente una sola base fuerte.

[0198] Los medios de estabilización catódicos para la ITP aniónica de la presente invención se deberían introducir en el aparato de electroforesis cerca del cátodo, contiguos a una solución de terminador que tiene la concentración de terminador inferior, e introduciendo la muestra y opcionalmente el medio espaciador contiguos al terminador diluido hacia el ánodo, pero antes del medio líder y del medio de estabilización líder.

I.B Medio de estabilización anódico

[0199] El medio de estabilización anódico para las aplicaciones de ITP aniónica se introduce en el aparato de electroforesis en la proximidad del ánodo. Así, este medio de estabilización "líder" para la ITP aniónica comprende al menos un ácido fuerte y al menos un compuesto que puede ser protonado (ionizado), con la condición de que la concentración del compuesto que puede ser protonado sea mayor que la concentración del ácido fuerte. Preferentemente, el compuesto que puede ser protonado es una base tampón según la definición usada anteriormente en la presente memoria.

[0200] Típicamente, la base conjugada del ácido fuerte se selecciona para que sea idéntica al ion líder que tiene la mayor movilidad electroforética en la ITP aniónica. Un ácido fuerte en el contexto de las aplicaciones de ITP aniónica se debería entender que incluye ácidos cuyo valor de pKa es al menos dos, y más preferentemente 3 o incluso 4 unidades de pK menor que el pKa de la base tampón usada en el medio de estabilización para que sea capaz de desprotonar considerablemente la base tampón para conducir a la alta conductividad deseada en el medio de estabilización. Frecuentemente, los expertos en la materia preferirán ácidos fuertes tales como ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, o

ácido sulfúrico como ácido fuerte, debido a que los iones resultantes cloruro/bromuro/sulfato tienen una movilidad electroforética muy alta y de ese modo representan un candidato adecuado para el ion líder en la ITP aniónica.

5 **[0201]** En realizaciones preferentes, la concentración del al menos un ácido fuerte y de la base tampón en el medio de estabilización anódico será mayor con respecto a las concentraciones de los mismos compuestos en el medio líder. Típicamente, la concentración de los ácidos fuertes y de la base tampón en el medio de estabilización será mayor, independientemente entre sí, en un factor entre 1:5 y 50, aunque aumentos en un factor de 2 a 20, o incluso de 5 a 15 serán más frecuentes. A menudo se consiguen muy buenos resultados cuando la concentración del medio de estabilización anódico es aproximadamente 10 veces mayor tanto para el ácido fuerte como para la base tampón, aunque las concentraciones exactas dependerán de nuevo de las circunstancias y de la naturaleza del problema de separación.

15 **[0202]** Las concentraciones absolutas para las concentraciones de la base fuerte y de la base tampón en el medio de estabilización anódico para ITP aniónica estarán en el intervalo entre aproximadamente 10 mM en el extremo inferior y aproximadamente 500 mM en el extremo superior, aunque la solubilidad de un compuesto determinado determinará habitualmente el límite superior de concentración. En realizaciones preferentes, la concentración absoluta del ácido fuerte y de la base débil (mientras que se mantenga el requisito de que la concentración del ácido fuerte debería ser menor que la concentración de la base tampón) está a menudo entre aproximadamente 30 y 300, y más preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 mM para ambos compuestos.

20 **[0203]** La concentración real de ácidos tampón ionizados en los medios de estabilización catódicos de ITP y de bases tampón ionizadas en los medios de estabilización anódicos de ITP, respectivamente, se determinará principalmente mediante la concentración de la base fuerte o del ácido fuerte que está presente en el medio de estabilización respectivo.

25 **[0204]** Para separaciones de ITP catiónica, los criterios generales para los medios de estabilización son idénticos excepto en que los términos ánodo y cátodo, así como los términos ácidos y bases se tienen que intercambiar. Además, cualquier referencia a un valor de pKa mayor en comparación con otro valor de pKa necesita reemplazarse por la referencia a un valor de pKa menor, como se perfila en detalle a continuación.

30 II. Separación de ITP catiónica

II.A *Medio de estabilización anódico*

35 **[0205]** Un medio de estabilización anódico de ITP para ITP catiónica comprende un compuesto "terminador", es decir, un compuesto ionizable en el cual la forma catiónica del compuesto tiene la movilidad electroforética efectiva más lenta hacia el cátodo durante la electroforesis, y además comprende al menos un ácido fuerte.

40 **[0206]** Según el uso de los términos de la técnica (como se ha descrito anteriormente), el "terminador" en las aplicaciones de ITP catiónica es la especie catiónica que tiene la movilidad electroforética más lenta en la cámara de electroforesis. Dado que la movilidad electroforética también depende del grado de ionización, se entenderá que un compuesto terminador puede referirse a una forma iónica de un compuesto (por ejemplo, el ácido conjugado de una base débil), o a la propia base sin carga, que puede llegar a protonarse, y así a ionizarse hasta cierto grado dependiendo del pH del medio circundante.

45 **[0207]** Por lo tanto, el terminador es una base tampón según las definiciones presentadas anteriormente en la presente memoria. Dado que el grado de ionización en la ITP dependerá del contraion presente en la cámara de separación (típicamente una base tampón como contraion de los iones con el movimiento más rápido en el medio líder), la base tampón se debería seleccionar preferentemente con respecto al valor de pKa del ácido tampón del medio de estabilización líder. Así, el pKa de la base tampón en el medio de estabilización anódico de ITP debería ser preferentemente menor que el pKa del ácido tampón del medio líder. En realizaciones particularmente preferentes, la diferencia de pKa entre la base tampón y el ácido tampón del líder debería estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3,5, más preferentemente entre 1 y 3, y lo más preferentemente entre 1,5 y 2,5, siendo por supuesto el pKa de la base tampón menor que el pKa del ácido tampón.

55 **[0208]** Para evitar grandes e innecesarios cambios de pH, la concentración del compuesto terminador debería ser mayor que la concentración de al menos un ácido fuerte. Las proporciones de concentración dependerán habitualmente del problema de separación específico, pero estarán habitualmente entre 1,5:1 y 5:1 (terminador/ácido fuerte), pero también pueden estar entre 2:1 y 3:1, aunque también son posibles otras proporciones.

60 **[0209]** Las concentraciones absolutas adecuadas del compuesto terminador están habitualmente entre aproximadamente 10 mM en el extremo inferior y aproximadamente 500 mM en el extremo superior aunque, en la práctica, la solubilidad de un compuesto terminador determinado puede determinar el límite superior de concentración. En algunas realizaciones preferentes, la concentración absoluta del compuesto terminador está a menudo entre aproximadamente 30 y 300, y más preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 mM.

65

[0210] En base a las proporciones de concentración mencionadas anteriormente entre el terminador y el ácido fuerte, las concentraciones posibles del ácido fuerte son por lo tanto algo menores que las descritas para el terminador. Las concentraciones adecuadas del ácido fuerte pueden variar por lo tanto de menos de 10 mM a aproximadamente 400 mM, mientras que son ciertamente más preferentes las concentraciones en el intervalo de 50 a 200 mM. Un ácido fuerte en el contexto de las aplicaciones de ITP catiónica se debería entender que incluye ácidos cuyo valor de pKa es al menos dos, y preferentemente 3 o incluso 4 unidades de pK menor que el pKa de la base tampón. Muy a menudo, son preferentes ácidos fuertes tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, o ácido sulfúrico, debido a que son capaces de protonar considerablemente la base tampón del medio de estabilización catódico para conducir a la alta conductividad deseada.

10

[0211] Además, mientras que en principio se podría usar más de un ácido fuerte, el deseo de mantener el número de especies diferentes en la cámara de separación tan bajo como sea posible hará que los expertos en la materia normalmente empleen solo un único ácido fuerte.

[0212] Los medios de estabilización anódicos para la ITP catiónica de la presente invención se deberían introducir en el aparato de electroforesis cerca del ánodo, contiguos a una solución de terminador que tiene la concentración de terminador inferior, e introduciendo la muestra y opcionalmente el medio espaciador contiguos al terminador diluido hacia el cátodo, pero antes del medio líder y del medio de estabilización líder.

20 *II.B Medio de estabilización catódico*

[0213] El medio de estabilización catódico para las aplicaciones de ITP catiónica se introduce en el aparato de electroforesis en la proximidad del cátodo. Así, este medio de estabilización "líder" para la ITP catiónica comprende al menos una base fuerte y al menos un compuesto que puede ser desprotonado (ionizado), con la condición de que la concentración del compuesto que puede ser desprotonado sea mayor que la concentración de la base fuerte. Preferentemente, el compuesto que puede ser desprotonado es un ácido tampón según la definición usada anteriormente en la presente memoria.

[0214] Típicamente, el ácido conjugado de la base fuerte se selecciona para que sea idéntico al ion líder que tiene la mayor movilidad electroforética en la ITP catiónica. Una base fuerte en el contexto de las aplicaciones de ITP catiónica se debería entender que incluye bases cuyo valor de pKa es al menos dos, y más preferentemente 3 o incluso 4 unidades de pK mayor que el pKa del ácido tampón usado en el medio de estabilización para que sea capaz de desprotonar considerablemente el ácido tampón para conducir a la alta conductividad deseada en el medio de estabilización. Frecuentemente, los expertos en la materia preferirán bases fuertes tales como hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos (KOH, NaOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, etc.), debido a que los iones metálicos resultantes tienen una movilidad electroforética muy alta y de ese modo representan un candidato adecuado para el ion líder en la ITP catiónica.

[0215] En ciertas realizaciones, la concentración de la al menos una base fuerte y del ácido tampón en el medio de estabilización catódico para la ITP catiónica será mayor con respecto a las concentraciones de los mismos compuestos en el medio líder. Típicamente, la concentración de las bases fuertes y de los ácidos tampón en el medio de estabilización es mayor, independientemente entre sí, en un factor entre 1:5 y 50, aunque aumentos en un factor de 2 a 20, o incluso de 5 a 15 serán más frecuentes. A menudo se consiguen resultados favorables cuando la concentración del medio de estabilización catódico es aproximadamente 10 veces mayor tanto para la base fuerte como para el ácido tampón, aunque las concentraciones exactas dependerán de nuevo de las circunstancias y de la naturaleza del problema de separación.

[0216] Las concentraciones absolutas para las concentraciones de la base fuerte y del ácido tampón del medio de estabilización catódico para la ITP catiónica estarán en el intervalo entre aproximadamente 10 mM en el extremo inferior y aproximadamente 500 mM en el extremo superior, aunque la solubilidad de un compuesto determinado determinará habitualmente el límite superior de concentración. En realizaciones preferentes, la concentración absoluta de la base fuerte y del ácido tampón (mientras que se mantenga el requisito de que la concentración de la base fuerte debería ser menor que la concentración del ácido tampón) está a menudo entre aproximadamente 30 y 300, y más preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 mM para ambos compuestos.

[0217] La concentración real de ácidos tampón y bases tampón ionizados en los medios de estabilización catódico y anódico, respectivamente, se determinará principalmente mediante la concentración de la base fuerte o del ácido fuerte que está presente en el medio de estabilización respectivo.

60 **III. Kits**

[0218] Será evidente para los expertos en la materia que los diversos medios de electroforéticos de separación y de estabilización descritos en la presente memoria se pueden proporcionar en forma de kit.

[0219] Por lo tanto, un kit comprende al menos uno de los medios electroforéticos descritos en la presente memoria. El

kit puede comprender uno o varios medios electroforéticos en forma de una solución acuosa que está lista para usarse (es decir, todos los componentes están presentes en la concentración deseada para el problema de separación electroforética), o puede comprender uno o varios medios en forma de una solución concentrada que se tiene que diluir con una cantidad predeterminada de agua antes de su uso. Alternativamente, el kit puede comprender uno o varios
5 medios en forma seca que comprenden los diversos ingredientes de un medio en varios, pero preferentemente en un contenedor que se reconstituye a continuación con una cantidad predeterminada de agua antes de su uso en un proceso de separación electroforética.

[0220] Preferentemente, cada medio (medio de estabilización catódico, medio de estabilización anódico, medio de separación), estará presente en un envase separado, aunque será evidente para los expertos en la materia que en ciertas situaciones pueden ser posibles y útiles otras combinaciones y presentaciones. Por ejemplo, se ha mencionado anteriormente que los medios de separación para aplicaciones de IEF pueden consistir en un número distinto de "subfracciones" que tienen diferentes concentraciones de los ingredientes (y de ese modo un pH diferente) para crear un gradiente de pH preformado en el aparato de electroforesis. El número de subfracciones empleadas en las
10 aplicaciones de IEF dependerá del problema de separación, del intervalo de pH deseado que se consigue con el medio de separación y del aparato de electroforesis usado para la separación. En aplicaciones de electroforesis de flujo libre, el aparato comprende típicamente varias entradas de medios E (por ejemplo, N = 7, 8 o 9 entradas), de modo que los submedios que crean el espacio de separación en el aparato se pueden introducir por al menos una y hasta un máximo de N-2 entradas (al menos una entrada en cada lado se reserva habitualmente para el medio de estabilización).
15

[0221] Los kits descritos en la presente memoria comprenden al menos un medio de separación. En algunos ejemplos, el medio de separación del kit formará un pH prácticamente constante y es por lo tanto particularmente útil para las aplicaciones de ZE. En otros ejemplos, el medio de separación (o varios medios de separación que forman las subfracciones del medio de separación) formarán un gradiente de pH durante la separación electroforética y serán por lo tanto particularmente útiles para las aplicaciones de IEF. Se contempla que todos los medios de separación descritos en
20 la presente memoria, sean preferentes o no, se pueden incluir en los kits.

[0222] El kit puede comprender al menos un medio de estabilización como se describe en la presente memoria. El medio de estabilización puede ser un medio de estabilización catódico o un medio de estabilización anódico. Dado que se requiere una estabilización tanto anódica como catódica para una FFE satisfactoria, el kit comprenderá preferentemente un medio de estabilización catódico y un medio de estabilización anódico como se definen en la presente memoria. En algunos ejemplos, el kit comprenderá medios de estabilización catódicos y/o anódicos que son útiles para las aplicaciones de ZE, mientras que en otras realizaciones preferentes, el kit comprende medios de estabilización catódicos y/o anódicos útiles para las aplicaciones de IEF. En otros ejemplos, el kit contendrá medios de
30 estabilización catódicos y/o anódicos adaptados para su uso en las aplicaciones de ITP. Típicamente, los medios de estabilización incluidos en los kits tendrán una conductividad eléctrica que es mayor que la del medio de separación, y será habitualmente al menos aproximadamente 500 $\mu\text{S/cm}$, y preferentemente incluso más de 1000 $\mu\text{S/cm}$, o incluso más de 2000 $\mu\text{S/cm}$, aunque será evidente para los expertos en la materia que la conductividad absoluta que se requiere dependerá de la conductividad del medio de separación que puede ser muy baja para ciertas aplicaciones.
35

[0223] El kit puede incluir todos los medios que se requieren para una separación electroforética determinada, es decir, un medio de estabilización catódico y anódico, así como un medio de separación (que puede consistir en varias subfracciones como se ha explicado anteriormente). Los medios de separación y los medios de estabilización se seleccionarán por supuesto de modo que sean útiles para el modo de operación destinado, sea ZE, IEF o ITP. Para las
40 aplicaciones de ITP, el kit comprenderá al menos el medio de estabilización catódico y anódico, y puede contener opcionalmente el medio terminador y líder, así como una o más soluciones espaciadoras como se describen en la presente memoria.

[0224] Se entenderá que la conductividad eléctrica de los medios de estabilización de los kits que comprenden todos los medios que se requieren para las separaciones electroforéticas será mayor que la conductividad del medio de separación. Como se explica en la presente memoria, el aumento de conductividad del medio de estabilización anódico (ASM) se obtendrá incluyendo un ácido fuerte en el ASM, en el cual el ácido fuerte se selecciona preferentemente entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y otros ácidos que tienen un pKa que es al menos 3 unidades de pKa menor que el pKa de la base tampón de dicho medio. El aumento de conductividad del medio de estabilización catódico
45 (CSM) se obtendrá añadiendo una base fuerte, en el cual la base fuerte se selecciona preferentemente entre un hidróxido de metal alcalino tal como NaOH o KOH, un hidróxido de mezcal alcalinotérrico tal como $\text{Mg}(\text{OH})_2$ o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, y otras bases que tienen un pKa que es al menos 3 unidades de pKa mayor que el pKa del ácido tampón de dicho medio.
50

[0225] Se entenderá que se pueden incluir en los kits todos los medios de estabilización catódicos y/o anódicos preferentes, así como los medios de separación preferentes descritos en la presente memoria.

[0226] Opcionalmente, los kits pueden comprender además instrucciones para el uso de los medios en las aplicaciones electroforéticas.
55

65

III.1 Usos y métodos de los medios de electroforesis

[0229] Los medios y los kits descritos en la presente memoria se usan para la separación de analitos mediante electroforesis de flujo libre (FFE).

5

[0230] Entre los analitos que se van a separar, fraccionar, enriquecer o empobrecer se encuentran biopartículas o biopolímeros, tales como liposomas, nanotubos, células, orgánulos celulares, virus, partículas víricas, bacterias, membranas, proteínas tales como lipoproteínas, complejos de proteínas, agregados de proteínas, ADN, complejos ADN-proteína, cromatina, péptidos, combinaciones de los mismos y similares. Sin embargo, también se pueden separar polímeros y partículas con carga superficial modificada no biológicos tales como resinas de melanina, partículas de pintura de látex, poliestirenos, polimetilmetacrilatos, dextranos, derivados de celulosa, combinaciones de los mismos y similares mediante electroforesis de flujo libre (FFE) empleando medios de separación y de estabilización.

[0231] Los medios y los kits descritos en la presente memoria se pueden usar para la separación de analitos mediante electroforesis de zona de flujo libre (FF-ZE). Los medios y los kits descritos en la presente memoria se pueden usar para la separación de analitos mediante isoelectroenfoque de flujo libre (FF-IEF). Los medios y los kits descritos en la presente memoria también se pueden usar para la separación de analitos mediante isotacoforesis de flujo libre (FF-ITP).

[0232] La separación sin portador de analitos mediante electroforesis de flujo libre, se puede llevar a cabo en modo continuo, en modo de intervalo (o discontinuo), o en modo cíclico de intervalos.

[0233] El modo continuo en el contexto de la electroforesis de deflexión de flujo libre se debería entender que significa que la etapa de inyección así como la etapa de separación se producen continua y simultáneamente. En la FFE en modo continuo, la separación electroforética se produce mientras el medio y los analitos pasan a través de la cámara de electroforesis en la cual se van a separar las diferentes especies según su pI (IEF), densidad de carga neta (ZE) o movilidad electroforética (ITP). El modo continuo permite la inyección y la recuperación continuas de los analitos sin la necesidad de llevar a cabo varios "procesos" independientes (entendiéndose un proceso como una secuencia de inyección de muestra, separación y posterior recolección y/o detección). Se entenderá que la FFE en modo continuo incluye técnicas de separación en las cuales el caudal neto global se reduce (pero no se para) en comparación con el caudal neto global inicial mientras que los analitos pasan por el espacio de separación entre los electrodos para aumentar el tiempo de separación. En el último caso, sin embargo, no se puede hablar de un verdadero modo continuo debido a que la reducción del caudal neto global solamente tendrá sentido para una cantidad limitada de muestra.

[0234] El modo de intervalo como se usa junto con la electroforesis de deflexión de flujo libre también se ha descrito en la técnica. Por ejemplo, se muestra un procedimiento de electroforesis de deflexión no continuo (es decir, de intervalo) en la patente US 6.328.868. En esta patente, se introducen en una cámara de electroforesis tanto la muestra como el medio de separación y, a continuación, se separan usando un modo de electroforesis tal como electroforesis de zona, isotacoforesis, o isoelectroenfoque, y finalmente se expulsan de la cámara a través de salidas de fraccionamiento. Las realizaciones de la patente US 6.328.868 describen que el movimiento de los medios de separación y de la muestra es unidireccional, desplazándose desde el extremo de entrada hacia el extremo de salida de la cámara. Esta dirección, a diferencia de la electroforesis capilar tradicional, se comparte mediante la orientación de los electrodos alargados. En el modo estático de intervalos descrito, por ejemplo en la invención US 6.328.868, la aceleración de la muestra entre los electrodos causada por una bomba o algún otro elemento de desplazamiento de fluidos solamente tiene lugar cuando el campo eléctrico está desconectado o al menos cuando la tensión para la migración electroforética no es efectiva, es decir, cuando ninguna parte de la muestra se está sometiendo a un campo eléctrico.

[0235] En otras palabras, el procedimiento de intervalo se caracteriza por una fase de carga en la cual se introducen la muestra y los medios en la cámara de separación del aparato electroforesis, seguido por un procedimiento de separación en el cual se detiene el flujo neto global del medio que incluye la muestra mientras se aplica un campo eléctrico para conseguir la separación. Después de la separación/fraccionamiento de la muestra, el campo eléctrico se desconecta o se reduce para que no sea efectivo y se conecta de nuevo el flujo neto global de modo que la muestra fraccionada se conduce hacia el extremo de salida y se recolecta/detecta posteriormente en un envase adecuado, por ejemplo, en una placa de microtitulación.

[0236] El denominado modo cíclico o cíclico de intervalos en el contexto de la electroforesis de flujo libre como se usa en la presente memoria se ha descrito en los documentos intermedarios WO 2008/053047 y WO 2008/025806. En síntesis, el modo se caracteriza por al menos una, y múltiples posibles inversiones de la dirección del flujo neto global mientras que la muestra se mantiene en el campo electroforético entre los electrodos alargados. A diferencia del modo estático de intervalos, la muestra está constantemente en movimiento permitiendo de este modo una mayor intensidad del campo y así una mejor (o más rápida) separación. Además, al invertir el flujo neto global de la muestra entre los electrodos alargados, se puede aumentar considerablemente el tiempo de residencia de los analitos en el campo eléctrico, ofreciendo de ese modo un aumento del tiempo de separación y/o mayor efectividad de separación y mejor resolución. La inversión del flujo neto global en cualquiera de las direcciones paralelas a los electrodos alargados (denominado ciclo) se puede repetir tantas veces como sea necesario en la situación específica, aunque las razones prácticas y el deseo de obtener una separación en un tiempo corto limitarán típicamente el número de ciclos que se

llevan a cabo en este modo. Después de haber conseguido el fraccionamiento deseado de los analitos de la muestra, se desconecta habitualmente el campo eléctrico y las fracciones se expulsan del aparato en el extremo de salida y se recolectan/detectan en un envase adecuado, por ejemplo, en una placa de microtitulación.

5 IV. Aplicaciones específicas

[0238] La presente invención se refiere a métodos de electroforesis que se aplican ampliamente para la separación o fraccionamiento satisfactorio de una amplia diversidad de analitos diferentes. Los métodos de electroforesis proporcionados en la presente memoria proporcionan una calidad de separación y reproducibilidad excelentes, ofreciendo de ese modo a los expertos en la materia técnicas adicionales no disponibles hasta el momento que usan el equipamiento y la tecnología disponible en la técnica.

[0239] Estos métodos de electroforesis se llevan a cabo en el contexto de la electroforesis de flujo libre. Típicamente, la electroforesis de flujo libre se refiere generalmente a una técnica en la cual la dirección de flujo del medio de separación/medios de separación y, opcionalmente, de medios adicionales tales como medios de estabilización y de contracorriente, es/es prácticamente paralela a los electrodos alargados, es decir, prácticamente perpendicular a las líneas de corriente del campo eléctrico generado por los electrodos.

[0240] Como se explicará con mayor detalle a continuación, una muestra que se va a separar según un método electroforético de flujo libre de la presente invención se puede introducir en una cámara de separación junto con cualquier medio de separación como se define en la presente memoria que se introduce en dicha cámara a través de uno de las entradas de medios. Además, dicho método electroforético de flujo libre ofrece la ventaja de que la muestra se puede introducir a través de una entrada o entradas de muestra dedicadas y separadas en el aparato de FFE adecuado para llevar a cabo dicho método.

[0241] Por lo tanto, se proporcionan métodos de electroforesis de la presente invención que comprenden (a) introducir en una cámara de electroforesis al menos un medio de estabilización anódico, al menos un medio de estabilización catódico y al menos un medio de separación; (b) introducir uno o más analitos en el al menos un medio de separación; (c) someter los medios y los analitos a un campo electroforético; y, opcionalmente, (d) eluir todos o parte de los analitos desde la cámara de electroforesis, en el cual el al menos un medio de separación es un medio de separación según la presente invención.

[0242] Tanto el medio de estabilización anódico como el medio de estabilización catódico son medios de estabilización como se definen en la presente memoria.

[0243] La muestra que se va a separar se añade al medio de separación que está presente en el espacio de separación entre el ánodo o ánodos y el cátodo o cátodos de un aparato de FFE, o se introduce preferentemente por separado en el espacio de separación de un aparato de FFE, típicamente a través de entradas de muestra (S) dedicadas que se proporcionan en el aparato de FFE. Los medios de separación y los medios de estabilización se introducen típicamente en un espacio de separación o una cámara de separación a través de entradas de medios (E), como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 1. Las entradas de muestra se pueden posicionar independientemente de las entradas de medios en el aparato de FFE y a menudo se localizan corriente abajo de las entradas de medios (véase de nuevo, por ejemplo, la Figura 1). Además, se pueden posicionar en cualquier posición deseada entre el ánodo y el cátodo del aparato de FFE. Típicamente, la cámara de separación, en o cerca de (es decir, en la proximidad de) el primer extremo, contiene al menos una entrada de muestra para la inyección de la muestra y una multiplicidad de entradas de medio para la inyección de al menos un medio de separación, y opcionalmente los medios de estabilización. En la proximidad del segundo extremo se localizan típicamente una pluralidad de puertos de recolección de muestra y, opcionalmente, una o más entradas de medios de contracorriente, es decir, cualquier método descrito en la presente memoria puede comprender también el uso de medios de contracorriente como se explica con mayor detalle, por ejemplo, en el documento WO 2006/119001. Tanto las salidas de recolección como las entradas de medios de contracorriente (si estuviera presente más de uno) se disponen típicamente a lo largo de una línea perpendicular a la dirección del flujo neto global.

[0244] Después de introducir los analitos en una cámara de electroforesis adecuada mediante su introducción conjunta con un medio de separación, mediante una entrada de muestra o mediante cualquier otro método posible, los diversos analitos de la muestra en el medio de separación se separan a continuación aplicando un campo eléctrico mientras se conducen hidráulicamente hacia el extremo de salida del aparato de FFE.

[0245] Los dispositivos de FFE adecuados se conocen en la técnica y se comercializan, por ejemplo, con el nombre de Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ (BD GmbH, Alemania). Además, los dispositivos de FFE adecuados que se pueden usar con los medios de separación y de estabilización de la presente invención se han descrito en una diversidad de solicitudes de patente, incluyendo la patente US 5.275.706, la patente US 6.328.868, las solicitudes de patente US pendientes de publicación US 2004/050697, US 2004/050698, US 2004/045826, y US 2004/026251, y los documentos intermediarios WO 2008/053047 y WO 2008/025806.

[0246] Los métodos de electroforesis pueden comprender las etapas de proporcionar un medio de separación electroforética que tiene un perfil de pH generalmente plano y una conductividad generalmente menor de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, introducir una muestra que comprende analitos, al menos una parte de los cuales tienen una carga superficial neta única y diferenciable, en el medio de separación, y separar o fraccionar los analitos tales como liposomas, partículas víricas, etc. mediante electroforesis de zona de flujo libre.

[0247] Los analitos que se van a separar en el método de electroforesis se seleccionan entre el grupo que consiste en biopartículas o biopolímeros, que incluyen, pero no se limitan a, liposomas, nanotubos, células, orgánulos celulares, virus, partículas víricas, bacterias, membranas, proteínas, agregados de proteínas, complejos de proteínas, ADN, complejos ADN-proteína, cromatina, péptidos, cualquier combinación de los mismos y similares, y polímeros y partículas con carga superficial modificada no biológicos, que incluyen, pero no se limitan a, resinas de melanina, partículas de pintura de látex, poliestirenos, polimetilmetacrilatos, dextranos, derivados de celulosa, cualquier combinación de los mismos y similares.

[0248] En realizaciones preferentes de este aspecto de la invención, la conductividad eléctrica es menor de 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$, aunque muy a menudo, la conductividad será incluso inferior, tal como menor de aproximadamente 500, 400, 300, 200, 100 o incluso 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

[0249] En ciertas realizaciones, los analitos que se van a separar mediante los métodos de electroforesis según la presente invención se seleccionan entre el grupo de biopolímeros y biopartículas, y preferentemente entre partículas que tienen una superficie relativamente grande y lisa y que tienen una carga superficial neta relativamente baja. En una realización particularmente preferente, el método de electroforesis descrito en la presente memoria se usará para la separación de liposomas.

[0250] Los liposomas son vesículas esféricas con una membrana compuestas típicamente de un fosfolípido y una bicapa de colesterol. Pueden estar compuestos de fosfolípidos de origen natural con cadenas lipídicas mixtas (tales como fosfatidiletanolamina de huevo), o de componentes tensioactivos puros tales como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina). Los liposomas pueden ser unilamerales o multilamerales, es decir, compuestos de numerosas capas. A menudo contienen (pero no necesariamente) un núcleo con una solución acuosa. Los liposomas se han considerado de gran interés debido a que tienen numerosas aplicaciones interesantes y con un amplio potencial. Por ejemplo, los liposomas se usan habitualmente como agentes de suministro de fármacos, o se pueden usar para la transformación o transfección de ADN.

[0251] Dado que los liposomas se preparan típicamente de forma sintética a partir de una diversidad de componentes diferentes, las poblaciones de liposomas obtenidas no son necesariamente uniformes en sus características y composición individual. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de controlar/analizar las condiciones de producción de los liposomas, y en ciertas condiciones incluso el deseo de fraccionamiento preparativo de poblaciones de liposomas que tienen propiedades diferentes. Se ha encontrado que los métodos de electroforesis proporcionados en la presente memoria son particularmente adecuados para el fraccionamiento preparativo o analítico de poblaciones de liposomas no homogéneas.

[0252] En realizaciones preferentes del método de electroforesis, el medio de separación comprende un ácido tampón y una base tampón, con la condición de que el pKa del ácido tampón sea mayor que el pKa de la base tampón. Los ácidos y las bases tampón se seleccionan preferentemente de modo que la diferencia de pKa entre el ácido tampón y la base tampón en el medio de separación (ΔpKa) esté entre 0,8 y 2,5, y más preferentemente entre 1,0 y 2,3. Se han conseguido resultados particularmente buenos en ciertas realizaciones en las cuales ΔpKa está entre 1,2 y 1,8.

[0253] Para ciertos analitos, en particular biopolímeros y biopartículas sensibles, el ácido tampón y la base tampón se seleccionan de modo que el pH del medio de separación esté entre aproximadamente 5 y 9, y a menudo entre aproximadamente 6 y 8. Se han conseguido resultados excelentes con medios de separación que tienen un pH casi neutro, es decir, aproximadamente pH 7, aunque el método de electroforesis se puede llevar a cabo principalmente a cualquier pH adecuado entre aproximadamente pH 2 y 12 como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Se entenderá que la selección de los respectivos ácidos tampón y bases tampón dependerá generalmente del problema de separación y de la naturaleza y requisitos de estabilidad del analito de interés. Para fraccionamientos de liposomas, el pH del medio de separación variará normalmente de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9.

[0254] La densidad del medio de separación se puede adaptar a la densidad de la muestra mediante la adición de un aditivo sin carga. Los posibles aditivos ya se han mencionado en la presente memoria. Un aditivo particularmente preferente es sacarosa, aunque se pueden emplear igualmente otros aditivos.

[0255] Debido a que se desea típicamente mantener intactos los liposomas, el pH del medio de separación se debería adaptar de modo que asegure la integridad estructural de los liposomas durante el procedimiento de separación (por ejemplo, ajustando a un pH o a un intervalo de pH cercano a pH = 7). Por ejemplo, se consiguieron buenos resultados de separación de liposomas usando un medio de separación que contenía EPPS 50 mM, BISTRIS 50 mM y sacarosa 250 mM en el cual la adición de sacarosa ajusta la densidad del medio de separación. La separación se puede llevar a

cabo usando, por ejemplo, electroforesis de zona de FF cíclica de intervalos.

- [0256]** La separación de virus según la presente invención es otro ejemplo no limitante de separación de biopartículas con los medios proporcionados en la presente memoria. Se consiguieron buenos resultados de separación usando por ejemplo un método según la presente invención para separar virus y partículas víricas en condiciones nativas con electroforesis de zona de intervalo. En este ejemplo, el medio de separación empleado contenía morfolinoetanol 50 mM y TAPS 50 mM. Además, se añadió sacarosa 200 mM, así como pequeñas cantidades de HPMC y un tensioactivo (TWEEN 80®) para optimizar las condiciones de separación.
- 10 **[0257]** El método de electroforesis comprende además la etapa de proporcionar un medio de estabilización anódico y catódico como se describen en la presente memoria. El medio de estabilización anódico y catódico se introducirán generalmente en la vecindad del ánodo y del cátodo del aparato de electroforesis, respectivamente. El método de electroforesis se lleva a cabo en modo de matriz libre, es decir, en una solución libre (FFE-ZE).
- 15 **[0258]** Cuando se lleva a cabo el método de electroforesis, preferentemente el flujo neto global de la muestra y de los medios será generalmente paralelo a la dirección del ánodo y del cátodo durante un cierto período de tiempo.
- [0259]** El flujo neto global de la muestra se puede mantener prácticamente constante durante el método de electroforesis, particularmente durante la fase de separación. Se entenderá que la muestra se introduce típicamente, pero no necesariamente, en el espacio de separación con un caudal menor, mientras que la etapa de elución de la muestra fraccionada también se puede llevar a cabo con un caudal neto global mayor.
- 20 **[0260]** En ciertas otras realizaciones, es preferente no detener o ralentizar el flujo neto global de la muestra y de los medios mientras se aplica el campo eléctrico, de modo que permita un tiempo de separación suficiente entre los dos electrodos. Otras realizaciones preferentes incluyen la etapa adicional de conectar el flujo neto global de la muestra y del medio para eluir y opcionalmente también recolectar las fracciones diferenciadas. Este modo de operación se denomina a menudo modo de intervalo o modo estático de intervalos, como se ha explicado con mayor detalle anteriormente.
- 25 **[0261]** En aún otras realizaciones preferentes, el método de electroforesis se lleva a cabo de modo que la dirección del flujo neto global de la muestra y de los medios se invierte al menos una vez mientras se aplica el campo eléctrico. Preferentemente, la inversión de la dirección del flujo neto global se repite tanto como sea necesario para conseguir una separación/fraccionamiento aceptable del analito. Este último se denomina a menudo modo cíclico de intervalos como se ha explicado con mayor detalle anteriormente (véase también la Figura 10).
- 30 **[0262]** El caudal neto global se adapta generalmente a la situación y aparato específicos, aunque se entenderá que el caudal neto global de la muestra y de los medios es típicamente menor durante la fase de separación en comparación con la fase de carga y/o elución, particularmente para aplicaciones de FFE cíclica de intervalos y estática de intervalos.
- 35 **[0263]** El método de electroforesis proporcionado en la presente memoria incluye preferentemente la etapa de eluir una parte de los analitos de interés, tales como liposomas, en fracciones diferenciadas.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Separación catiónica realizada en modo FF-ZE

- 45 **[0265]** Se ensayó la capacidad del medio de separación y de los medios de estabilización para separar un extracto celular total de células HeLa en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ que se proporciona con 7 entradas (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo en el aparato a través de la entrada de muestra anódica S1. El tiempo total de la separación de electroforesis fue de 10 minutos. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. La tensión aplicada fue de 850 V y la corriente fue de 42 mA. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ZE cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.
- 50 **[0266]** El protocolo de separación usado fue el siguiente:
- Medio de estabilización anódico (entrada 1): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + H₂SO₄ 100 mM + glicil 30 mM + ácido 2-amino-butírico 250 mM;
- 55 Medio de separación (entradas 2-6): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + ácido acético 50 mM + glicil-glicina 50 mM;
- Medio de estabilización catódico (entrada 7): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + NaOH 150 mM + Tris 30 mM + HAC 30 mM + ácido piridinaetanosulfónico (PES) 250 mM.

65

[0267] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 2A. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 2A, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. Después de la separación, la muestra se recogió en una placa de 96 pocillos y se analizó. Los resultados se informan en la Figura 2B que muestra la separación fraccionada de la presente muestra con dependencia del pH del medio de separación y del medio de estabilización. Cada segunda fracción de la FFE se analizó usando SDS-PAGE.

EJEMPLO 2: Separación simultánea catiónica y la aniónica en modo FF-ZE

[0268] Se ensayó la capacidad del medio de separación y del medio de estabilización para separar un extracto celular total de células HeLa en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ que se proporciona con 7 entradas (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S2. El tiempo total de electroforesis fue de 6 minutos. La tensión aplicada fue de 850 V y la corriente fue de 42 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ZE cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0269] El protocolo de separación usado fue:

Medio de estabilización anódico (entrada 1): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + H₂SO₄ 100 mM + creatinina 30 mM + EACA 250 mM;

Medio de separación (entradas 2-6): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + MES 50 mM + creatinina 50 mM;

Medio de estabilización catódico (entrada 7): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + NaOH 150 mM + Tris 30 mM + MES 30 mM + MOPSO 250 mM.

[0270] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 3A. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 3A, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. Después de la separación, la muestra se recogió en una placa de 96 pocillos y se analizó. Los resultados se informan en la Figura 3B que muestra la separación fraccionada de la presente muestra con dependencia del pH del medio de separación y del medio de estabilización. Cada segunda fracción de la FFE se analizó usando SDS-PAGE.

EJEMPLO 3: Separación aniónica realizada en modo FF-ZE

[0271] Se ensayó la capacidad del medio de separación y de los medios de estabilización para separar un extracto celular total de células HeLa en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ que se proporciona con 7 entradas (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S3. El tiempo total de electroforesis fue de 7 minutos. La tensión aplicada fue de 850 V y la corriente fue de 36 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ZE cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0272] El protocolo de separación usado fue el siguiente:

Medio de estabilización anódico (entrada 1): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + H₂SO₄ 100 mM + 2-Piridina-propanol 30 mM + 2-piridina-etanol 250 mM;

Medio de separación (entradas 2-6): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + MOPS 50 mM + 2-Piridina-propanol 50 mM;

Medio de estabilización catódico (entrada 7): tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1% + NaOH 150 mM + TRIS 30 mM + MOPS 30 mM + EPPS 250 mM.

[0273] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 4A. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 4A, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. Después de la separación, la muestra se recogió en una placa de 96 pocillos y se analizó. Los resultados se informan en la Figura 4B que muestra la separación fraccionada de la presente muestra con dependencia del pH del medio de separación y del medio de estabilización. Cada segunda fracción de la FFE se analizó usando SDS-PAGE.

EJEMPLO 4: Modo FF-ZE

[0274] Se ensayaron el medio de separación y el medio de estabilización en un dispositivo de Electroforesis de Flujo Libre BD™ usando una muestra de control de calidad. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S4. El tiempo total de electroforesis fue de 10 minutos. La tensión aplicada fue de 600 V y la corriente fue de 80 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ZE cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0275] El protocolo de separación usó los siguientes medios:

Medio de estabilización anódico: sacarosa 250 mM + ácido sulfúrico 50 mM + BISTRIS 150 mM + MES 50 mM;
pH = 6,25, conductividad = 4510 μ S/cm;

Medio de separación: sacarosa 250 mM + BISTRIS 50 mM + EPPS 50 mM
pH = 7,23, conductividad = 264 μ S/cm;

Medio de estabilización catódico: sacarosa 250 mM + NaOH 100 mM + EPPS 150 mM + TRIS 50 mM
pH = 8,11, conductividad = 4590 μ S/cm.

[0276] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 5. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 5, se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

EJEMPLO 5: Modo FF-IEF

[0277] Se ensayaron el medio de separación y el medio de estabilización en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ en modo FF-IEF usando una solución de control de calidad. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S1. El tiempo total de electroforesis fue de aproximadamente 50 minutos. La tensión aplicada fue de 1200 V y la corriente fue de 30 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-IEF cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0278] El protocolo usado para el presente proceso fue:

Medio de estabilización ácido: glicerol al 25% + HPMC al 0,2% + H₂SO₄ 100 mM + HAc 50 mM + EACA 200 mM + 4-piridina-propanol 100 mM
pH = 4,89; conductividad = 5840 μ S/cm;

Medio de separación: glicerol al 25% + HPMC al 0,2% + Servalyt al 1% 6-8
pH = 7,48; conductividad = 85 μ S/cm;

Medio de estabilización catódico: glicerol al 25% + HPMC al 0,2% + NaOH 150 mM + etanolamina 30 mM + CAPSO 250 mM
pH = 10,0; conductividad = 4160 μ S/cm.

[0279] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 6. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 6, se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

EJEMPLO 6: Modo FF-IEF

[0280] Se ensayaron el medio de separación y el medio de estabilización en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ en modo FF-IEF usando una solución de control de calidad. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S2. El tiempo total de electroforesis fue de aproximadamente 60 minutos. La tensión aplicada fue de 900 V y la corriente fue de 35 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-IEF cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0281] El protocolo de separación usado fue:

Medio de estabilización anódico: urea 7 M + tiourea 2 M + ácido sulfúrico 100 mM
pH = 2,21, conductividad = 9550 μ S/cm;

- 5 Medio de separación: urea 7 M + tiourea 2 M + Servalyt 2-4 al 0,75% + Servalyt 4-6 al 0,75%;
pH = 4,89, conductividad = 198 μ S/cm;

Medio de estabilización catódico: urea 7 M + tiourea 2 M + NaOH 150 mM + TRIS 50 mM + HEPES 200 mM + MOPSO 50 mM

- 10 pH = 8,18, conductividad = 4980 μ S/cm.

[0282] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 7. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 7, se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

EJEMPLO 7: Modo FFE de gradiente de pH ultraplano

[0283] Se ensayaron el medio de separación y el medio de estabilización en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ usando una solución de control de calidad. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S2. El tiempo total de electroforesis fue de aproximadamente 60 minutos. La tensión aplicada fue de 900 V y la corriente fue de 35 mA. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 2 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-IEF cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0284] Para crear un gradiente de pH ultraplano se usaron cinco medios de separación con un pH ligeramente diferente. Los medios de separación y los medios de estabilización se introdujeron cada uno en una entrada en el siguiente orden:

- 30 Medio de estabilización anódico (entrada E1): HPMC al 0,2% + ácido sulfúrico 50 mM + ácido acético 30 mM + MOPS 20 mM + piridina-2-propanol 30 mM + 2-hidroxi-metil-piridina 50 mM; pH = 4,77, conductividad = 6320 μ S/cm;

Medio de separación 1 (entrada E2): HPMC al 0,2% + piridina-2-propanol 40 mM + TAPS 60 mM; pH = 6,85, conductividad = 120 μ S/cm;

- 35 Medio de separación 2 (entrada E3): HPMC al 0,2% + piridina-2-propanol 50 mM + TAPS 50 mM; pH = 6,89, conductividad = 120 μ S/cm;

- 40 Medio de separación 3 (entrada E4): HPMC al 0,2% + piridina-2-propanol 60 mM + TAPS 40 mM; pH = 7,00, conductividad = 116 μ S/cm;

Medio de separación 4 (entrada E5): HPMC al 0,2% + piridina-2-propanol 70 mM + TAPS 30 mM; pH = 7,10, conductividad = 112 μ S/cm;

- 45 Medio de separación 5 (entrada E6): HPMC al 0,2% + piridina-2-propanol 80 mM + TAPS 20 mM; pH = 7,24, conductividad = 104 μ S/cm;

Medio de estabilización catódico (entrada E7): HPMC al 0,2% + NaOH 100 mM + imidazol 40 mM + TAPS 30 mM + AMPSO 150 mM; pH = 9,0, conductividad = 5100 μ S/cm.

50 [0285] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 8. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 8, se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

EJEMPLO 8: Separación de FF-ITP aniónica

[0286] Se ensayaron la solución líder y los medios de estabilización en un Sistema de Electroforesis de Flujo Libre BD™ usando una solución de control de calidad. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada E6. El tiempo total de electroforesis fue de 10 minutos. La tensión aplicada fue de 1000 V y la corriente fue de 35 mA. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ITP cíclico de intervalos a 90 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

- 65 [0287] El protocolo de separación usado fue:

Medio de estabilización catódico: HPMC al 0,1% + sacarosa 250 mM + HEPES 150 mM + NaOH 100 mM;
pH = 7,7; conductividad = 2210 μ S/cm;

5 Líder: HPMC al 0,1% + sacarosa 250 mM + HCl 10 mM + morfolinoetanol 20 mM;
pH = 7,7; conductividad = 870 μ S/cm;

Medio de estabilización anódico: HPMC al 0,1% + sacarosa 250 mM + HCl 100 mM + morfolinoetanol 200 mM
pH = 7,0; conductividad = 6700 μ S/cm.

10

[0288] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 9. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 9, se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl.

15

EJEMPLO 9: Separación de ZE de intervalo realizada en condiciones de desnaturalización

[0289] Se evaluó la capacidad de los medios de separación y de los medios de estabilización para separar un extracto citosólico de *Xenopus laevis* en condiciones de desnaturalización en un dispositivo de Electroforesis de Flujo Libre BD™. El aparato se dispuso comprendiendo siete entradas de medios (E1-E7) y entradas de muestra (S1-S4). El medio de estabilización anódico se introdujo por la entrada E1. El medio de estabilización catódico se introdujo por la entrada E7 y la muestra se introdujo a través de la entrada de muestra S2. El tiempo total de electroforesis fue de 10 minutos. La intensidad de campo aplicada fue de 90 V/cm. La muestra y los medios se introdujeron con un caudal de 1,5 ml/h y 250 ml/h, respectivamente. El proceso se llevó a cabo en modo FF-ZE cíclica de intervalos a 100 ml/h y la muestra fraccionada se eluyó a 300 ml/h.

[0290] El protocolo de separación usó los siguientes medios:

Medio de estabilización anódico: H₂SO₄ 100 mM + Morfolinoetanol 250 mM + MES 50 mM + tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1%
pH = 7,11, conductividad = 6800 μ S/cm;

Medio de separación: Morfolinoetanol 50 mM + TAPS 50 mM + tiourea 2 M + urea 7 M + HPMC al 0,1%
pH = 8,1, conductividad = 278 μ S/cm;

35

Medio de estabilización catódico: NaOH 100 mM + TRIS 50 mM + TAPS 150 mM + urea 7 M + HPMC al 0,1%
pH = 9,3, conductividad = 3120 μ S/cm.

[0291] El pH de cada una de las fracciones de la FFE se determinó usando un electrodo de pH y se presenta en el gráfico de la Figura 11A. Se separaron los marcadores de pl coloreados para evaluar el rendimiento de separación del sistema. En la Figura 11A, también se informa de la absorbancia de cada fracción a $\lambda = 420$ nm, 515 nm y 595 nm que representan la absorbancia de los respectivos marcadores de pl. Después de la separación, la muestra se recogió en una placa de 96 pocillos y se analizó. Los resultados se informan en la Figura 11B que muestra la separación fraccionada de la presente muestra con dependencia del pH del medio de separación y del medio de estabilización.

45 Cada segunda fracción de la FFE se analizó usando SDS-PAGE.

REIVINDICACIONES

1. Método para la separación de analitos mediante electroforesis de flujo libre, donde la electroforesis de flujo libre se lleva a cabo con:
- 5 un medio de separación binario que contiene un ácido tampón y una base tampón, donde el valor de pKa del ácido tampón es mayor que el valor de pH del medio de separación, y donde el valor de pKa de la base tampón es menor que el valor de pKa del medio de separación; y caracterizado por
- 10 un medio de estabilización catódico que comprende al menos un ácido tampón y al menos una base fuerte; un medio de estabilización anódico que comprende al menos una base tampón y al menos un ácido fuerte; donde el medio de estabilización anódico y catódico tienen una conductividad mayor que el medio de separación, evitando de ese modo la contaminación cruzada entre el área de separación y el compartimento del electrodo del dispositivo de electroforesis
- 15 y donde el pH del medio de separación durante la electroforesis es prácticamente constante, o donde la diferencia de pH entre el lado anódico y el lado catódico está entre aproximadamente 0,2 y 3 unidades de pH durante la electroforesis.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medio de separación se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:
- 20 el valor de pKa del ácido tampón es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 unidades, preferentemente de 0,4 a 0,9 unidades mayor que el valor de pH del medio de separación; el valor de pKa de la base tampón es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 unidades, preferentemente de 0,4 a 0,9 unidades menor que el valor de pH del medio de separación;
- 25 la diferencia entre el valor de pH máximo y mínimo del medio de separación durante la electroforesis es más de aproximadamente 0,2 y menos de 3 unidades de pH, preferentemente donde la diferencia de pH está entre 0,5 y 2 unidades de pH, y más preferentemente entre 0,5 y 1,5 unidades de pH;
- 30 la diferencia entre el valor de pKa del ácido tampón y el valor de pKa de la base tampón (ΔpK_a) está entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 4,0, preferentemente entre 0,8 y 2,5 y más preferentemente entre 1,2 y 1,8, o donde la diferencia entre el valor de pKa del ácido tampón y el valor de pKa de la base tampón (ΔpK_a) está entre aproximadamente 2,5 y 4 y preferentemente entre aproximadamente 2,5 y 3,3;
- 35 el ácido tampón se selecciona entre sustancias tampón biológicamente aceptables, preferentemente se selecciona entre el grupo que consiste en HIBA, ácido acético, ácido picolínico, PES, MES, ACES, MOPS, HEPES, EPPS, TAPS, AMPSO, CAPSO, α -alanina, GABA, EACA, 4-hidroxipiridina, y 2-hidroxipiridina;
- 40 la base tampón se selecciona entre sustancias tampón biológicamente aceptables; preferentemente se selecciona entre el grupo que consiste en taurina, glicina, ácido 2-aminobutírico, glicilglicina, β -alanina, GABA, EACA, creatinina, piridina-etanol, piridina-propanol, histidina, BISTRIS, morfolinoetanol, trietanolamina, TRIS, amediol, bencilamina, dietilaminoetanol, trialquilaminas; y
- 45 el medio de separación comprende además uno o más de un aditivo, donde los aditivos se seleccionan preferentemente entre otros ácidos y/o bases, aniones y cationes mono y divalentes esenciales, potenciadores de la viscosidad, detergentes, agentes de solubilización de proteínas, ligandos de afinidad y agentes reductores, más preferentemente donde el aditivo se selecciona entre el grupo que consiste en tiourea, urea, derivados poliméricos hidrofílicos, tales como HPMC, PEGs, polialcoholes, tales como glicerol, hidratos de carbono tales como sacarosa, selectores quirales tales como dextrinas, o ciclodextrinas, lectinas, mercaptoetanol, ditiotreitil (DTT), iones calcio, iones magnesio, iones cinc, iones cloruro, iones sulfato, EDTA, EGTA, y azida.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho medio de separación se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:
- 50 la relación de concentración entre el ácido tampón y la base tampón varía de aproximadamente 9:1 para la fracción más cercana al ánodo a aproximadamente 1:9 para la fracción más cercana al cátodo, donde preferentemente las concentraciones del ácido tampón y de la base tampón en el medio de separación son aproximadamente iguales;
- 55 dicho medio de separación consiste en de al menos 2 a aproximadamente 15 fracciones separadas que comprenden concentraciones variables del ácido tampón y de la base tampón para proporcionar un gradiente de pH preformado, preferentemente donde dicho medio de separación comprende de 4 a 10 fracciones separadas; la concentración del ácido tampón e, independientemente entre sí, de la base tampón en el medio de separación es ≥ 5 mM, y preferentemente ≥ 10 mM, más preferentemente ≥ 20 mM, lo más preferentemente ≥ 50 mM; y
- 60 la conductividad del medio de separación está entre aproximadamente 30 y 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, o entre aproximadamente 50 y 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, o entre aproximadamente 50 y 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y más preferentemente entre aproximadamente 50 y 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho medio de estabilización catódico para electroforesis se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:

la concentración de la al menos una base fuerte del medio es suficiente para conseguir una desprotonación substancial de todos los ácidos usados en el medio de estabilización, preferentemente donde la relación de concentración entre el ácido o ácidos y la base o bases del medio de estabilización (relación de ácido o ácidos/base o bases) es al menos > 1 , pero < 50 , preferentemente donde la relación de concentración está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10; y
 5 el pH del medio de estabilización catódico es mayor que el pH del medio de separación; preferentemente donde
 10 el ácido tampón se selecciona entre ácidos o compuestos anfotéricos, con la condición de que el pKa de la función de base en el compuesto anfotérico sea al menos 3 unidades menor que el pKa de la función de ácido, donde la función de ácido tiene un pKa entre aproximadamente 3 y 13, más preferentemente donde dicho ácido tampón se selecciona entre el grupo que consiste en HIBA, ácido acético, ácido picolínico, PES, MES, ACES, MOPS, HEPES, EPPS, TAPS, AMPSO, CAPSO, α -alanina, GABA, EACA, 4-hidroxipiridina, y 2-hidroxipiridina; y/o
 15 la base fuerte se selecciona entre un hidróxido de metal alcalino, un hidróxido de metal alcalinotérreo y otras bases que tienen un pKa que es al menos 3 unidades de pK mayor que el pKa del ácido tampón de dicho medio.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho medio de estabilización catódico para electroforesis se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:

20 el medio de estabilización catódico comprende además al menos una base tampón, con la condición de que la concentración de todos los ácidos en dicho medio sea mayor que la concentración de todas las bases; el pKa de cada ácido tampón del medio de estabilización es igual o mayor que el pKa de cada ácido tampón usado en el medio de separación;
 25 el ΔpK_a entre el ácido tampón del medio de estabilización y el ácido tampón del medio de separación es menor que 1, preferentemente menor que 0,5; al menos un ácido tampón de dicho medio de estabilización tiene una movilidad electroforética y un pKa similar al ácido tampón usado en el medio de separación;
 y
 30 al menos un ácido tampón del medio de estabilización es idéntico al ácido tampón usado en el medio de separación.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el pKa de cada uno de los ácidos tampón en dicho medio de estabilización catódico es mayor que el pI del analito más alcalino de la muestra que se va a separar;
 35 y, opcionalmente, donde dicho medio de estabilización se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:

dicho medio de estabilización contiene más de un ácido tampón, preferentemente donde dicho medio de estabilización contiene al menos 2 o al menos 3 ácidos tampón;
 dicho medio de estabilización contiene además más de una base tampón;
 40 el valor de pKa de cada uno de los ácidos tampón del medio de estabilización es mayor que el valor de pH máximo del medio de separación, preferentemente donde el pKa de cada uno de los ácidos tampón del medio de estabilización está dentro del intervalo $(pI + 0,3) < pKa < (pI + 3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pI + 0,5) < pKa < (pI + 2)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pI + 0,5) < pKa < (pI + 1,3)$;
 45 el valor de pKa de cada ácido tampón está en el intervalo de $(pH_{max} + 0,3) < pKa < (pH_{max} + 3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pH_{max} + 0,5) < pKa < (pH_{max} + 2)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pH_{max} + 0,5) < pKa < (pH_{max} + 1,3)$;
 el pH del medio de estabilización es mayor que el pH máximo del medio de separación, preferentemente donde el pH del medio de estabilización catódico no excede del pH máximo del medio de separación en más de aproximadamente 2 unidades de pH;
 50 la concentración de los ácidos tampón que tienen un mayor pKa (ácidos débiles) en dicho medio de estabilización catódico está aumentada con respecto a la concentración del ácido tampón que tiene el menor pKa (ácido tampón más fuerte), preferentemente, donde la concentración de los ácidos más débiles está aumentada en un factor de al menos aproximadamente 2, y más preferentemente en un factor de al menos aproximadamente tres con respecto a la concentración del ácido tampón más fuerte de dicho medio;
 55 la concentración total de los ácidos tampón en dicho medio de estabilización catódico es de aproximadamente 1,1 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 2 a 20 veces, y lo más preferentemente de aproximadamente 5 a 15 veces mayor que la concentración del ácido tampón en el medio de separación,
 la concentración total de todos los ácidos tampón en el medio de estabilización es mayor de aproximadamente 20 mM, preferentemente mayor de aproximadamente 50 mM, y lo más preferentemente mayor de
 60 aproximadamente 200 mM.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medio de estabilización catódico se usa en la separación de analitos aniónicos mediante isotacoforesis de flujo libre (FF-ITP) y donde dicho medio de estabilización comprende un compuesto que tiene la movilidad electroforética efectiva más lenta hacia el ánodo (terminador), y comprende
 65 además al menos una base fuerte;

y, opcionalmente, donde

5 el terminador es un ácido tampón y el pKa del ácido tampón en dicho medio es preferentemente mayor que el pKa de la base tampón usada en el medio líder, más preferentemente donde la diferencia entre el pKa del ácido tampón del medio de estabilización catódico y el pKa de la base tampón del medio líder (ΔpKa) está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3, más preferentemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5; y/o

10 la concentración del terminador es mayor que la concentración de la al menos una base fuerte; y/o la concentración del terminador está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 500 mM, y preferentemente entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 200 mM;

o

15 donde dicho medio de estabilización catódico se usa en la separación de analitos catiónicos mediante isotacoforesis de flujo libre catiónica (FF-ITP), donde dicho medio de estabilización catódico comprende al menos una base fuerte y al menos un ácido tampón, donde la concentración del ácido tampón es mayor que la concentración de la base fuerte; y, opcionalmente, donde

20 la concentración de la al menos una base fuerte y del ácido tampón es mayor que la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP catiónica; y/o

25 la concentración de la al menos una base fuerte y del ácido tampón es mayor que la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP catiónica y la concentración del ácido tampón y/o de la al menos una base fuerte está, independientemente entre sí, aumentada en un factor entre 1,5 y 50 veces, preferentemente donde la concentración está aumentada entre 2 y 20 veces, y lo más preferentemente donde la concentración está aumentada entre 5 y 15 veces con respecto a la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP catiónica.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho medio de estabilización anódico para electroforesis se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:

30 la concentración del al menos un ácido fuerte en el medio es suficiente para conseguir una protonación sustancial de todas las bases usadas en el medio de estabilización;

35 donde preferentemente la relación de concentración entre la base o bases y el ácido o ácidos del medio de estabilización (relación de base o bases/ácido o ácidos) es al menos > 1 , pero < 50 , preferentemente donde la relación de concentración está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10;

el pH del medio de estabilización anódico es menor que el pH del medio de separación;

40 la base tampón se selecciona entre bases biológicamente aceptables y compuestos anfotéricos, con la condición de que el pKa de la función de ácido del compuesto anfotérico sea al menos 4 unidades mayor que el pKa de la función de base, preferentemente la base tampón se selecciona entre el grupo que consiste en taurina, glicina, ácido 2-aminobutírico, glicilglicina, β -alanina, GABA, EACA, creatinina, piridina-etanol, piridina-propanol, histidina, BISTRIS, morfolinoetanol, trietanolamina, TRIS, amediol, bencilamina, dietilaminoetanol, trialquilaminas; y

el ácido fuerte se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y otros ácidos que tienen un pKa que es al menos 3 unidades de pK menor que el pKa de la base tampón de dicho medio.

45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho medio de estabilización anódico para electroforesis se caracteriza además por al menos uno de los siguientes:

50 el medio de estabilización anódico comprende además al menos un ácido tampón, con la condición de que la concentración de todas las bases en dicho medio sea mayor que la concentración de todos los ácidos;

el pKa de cada base tampón en el medio de estabilización es igual o menor que el pKa de cada base tampón usada en el medio de separación;

ΔpKa entre la base tampón del medio de estabilización y la base tampón del medio de separación es menor que 1, preferentemente menor que 0,5;

55 al menos una base tampón del medio de estabilización tiene una movilidad electroforética similar a la base tampón usada en el medio de separación; y

al menos una base tampón del medio de estabilización es idéntica a la base tampón usada en el medio de separación.

60 10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde el pKa de cada una de las bases tampón del medio de estabilización anódico es menor que el pI del analito más ácido de la muestra que se va a separar; y, opcionalmente, donde dicho medio de estabilización anódico se define además por al menos uno de los siguientes:

65 el medio de estabilización anódico contiene más de una base tampón, preferentemente donde el medio de estabilización contiene al menos 2 o al menos 3 bases tampón;

el pKa de cada una de las bases tampón del medio de estabilización anódico está dentro del intervalo $(pI - 3) <$

$pK_a < (pI - 0,3)$, preferentemente dentro del intervalo $(pI - 2) < pK_a < (pI - 0,5)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pI - 1,3) < pK_a < (pI - 0,5)$;

el pH del medio de estabilización anódico es menor que el pH mínimo del medio de separación, preferentemente el pH del medio de estabilización anódico no es inferior de aproximadamente 2 unidades de pH por debajo del pH mínimo del medio de separación;

y

el valor de pK_a de cada una de las bases tampón del medio de estabilización anódico es mayor que el valor de pH mínimo del medio de separación, preferentemente donde el valor de pK_a de cada base tampón está en el intervalo de $(pH_{\min} - 3) < pK_a < (pH_{\min} - 0,3)$, más preferentemente dentro del intervalo $(pH_{\min} - 2) < pK_a < (pH_{\min} - 0,5)$, y lo más preferentemente dentro del intervalo $(pH_{\min} - 1,3) < pK_a < (pH_{\min} - 0,5)$.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde dicho medio de estabilización anódico se define además por al menos uno de los siguientes:

la concentración de las bases tampón del medio de estabilización anódico que tienen un menor pK_a (bases más débiles) está aumentado con respecto a la concentración de la base tampón que tiene el menor pK_a (base tampón más fuerte), preferentemente, donde la concentración de las bases más débiles está aumentada en un factor de al menos aproximadamente 2, y más preferentemente en un factor de al menos aproximadamente 3 con respecto a la concentración de la base tampón más fuerte de dicho medio; la concentración total de las bases tampón del medio de estabilización anódico es aproximadamente de 1,1 a 50 veces, preferentemente aproximadamente de 2 a 20 veces, y lo más preferentemente aproximadamente de 5 a 15 veces mayor que la concentración de la base tampón del medio de separación; y

la concentración total de todas las bases tampón del medio de estabilización anódico es mayor que aproximadamente 20 mM, preferentemente mayor que aproximadamente 50, y lo más preferentemente mayor que aproximadamente 200 mM.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medio de estabilización anódico se usa en la separación de analitos catiónicos mediante isotacoforesis de flujo libre (FF-ITP) y donde dicho medio de estabilización comprende un compuesto que tiene la movilidad electroforética más lenta hacia el cátodo (terminador), y comprende además al menos un ácido fuerte; y, opcionalmente, donde:

el terminador es una base tampón donde el pK_a de la base tampón en dicho medio es preferentemente menor que el pK_a del ácido tampón usado en el medio líder, donde más preferentemente la diferencia entre el pK_a de la base tampón del medio de estabilización catódico y el pK_a del ácido tampón del medio líder (ΔpK_a) está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3, más preferentemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5; y/o

la concentración del terminador es mayor que la concentración del al menos un ácido fuerte; y/o

la concentración del terminador está entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 500 mM, y preferentemente entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 200 mM;

o

donde dicho medio de estabilización anódico se usa en la separación de analitos aniónicos mediante isotacoforesis de flujo libre aniónica (FF-ITP), donde dicho medio de estabilización anódico comprende al menos un ácido fuerte y al menos una base tampón, donde la concentración de la base tampón es mayor que la concentración del ácido fuerte;

y, opcionalmente, donde

la concentración del al menos un ácido fuerte y de la base tampón es mayor que la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP aniónica, y/o

la concentración del al menos un ácido fuerte y de la base tampón es mayor que la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP aniónica y donde la concentración de la base tampón y/o del al menos un ácido fuerte está, independientemente entre sí, aumentado en un factor entre 1,5 y 50 veces, donde preferentemente la concentración está aumentada entre 2 y 20 veces, y más preferentemente donde la concentración está aumentada entre 5 y 15 veces con respecto a la concentración de los mismos compuestos en el medio líder de ITP aniónica.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el medio de estabilización anódico y/o catódico comprende además al menos un aditivo, preferentemente donde el al menos un aditivo se selecciona entre otros ácidos y/o bases, aniones y cationes mono y divalentes esenciales, potenciadores de la viscosidad, detergentes, agentes de solubilización de proteínas, ligandos de afinidad y agentes reductores, más preferentemente donde el al menos un aditivo se selecciona entre el grupo que consiste en tiourea, urea, derivados poliméricos hidrofílicos, tales como HPMC, PEGs, polialcoholes, tales como glicerol, hidratos de carbono tales como sacarosa, selectores quirales tales como dextrinas y ciclodextrinas, lectinas, mercaptoetanol, ditiotreitól (DTT), iones calcio, iones magnesio, iones cinc, iones cloruro, iones sulfato, EDTA, EGTA, y azida.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde

la conductividad de dicho medio de estabilización es mayor de aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferente mayor de aproximadamente 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y lo más preferentemente mayor de aproximadamente 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$;
y/o

5 la conductividad del medio de estabilización es mayor en un factor de al menos aproximadamente 3, y preferentemente de al menos aproximadamente 5, y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 10, que la conductividad del medio de separación.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la separación de poblaciones de liposomas
10 en una muestra mediante electroforesis de flujo libre, donde el medio de separación tiene una conductividad menor de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, preferentemente donde el medio tiene una conductividad menor de 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

16. El método de la reivindicación 15, donde

15 al menos una fracción de los liposomas tiene una movilidad electroforética efectiva menor de aproximadamente $20 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$; y/o

las concentraciones relativas del ácido tampón y de la base tampón en el medio de separación están entre 9:1 y 1:9, donde preferentemente la concentración del ácido tampón y de la base tampón en el medio de separación son prácticamente iguales; y/o

20 el pH del medio de separación está entre 6 y 8, donde preferentemente el medio de separación tiene un pH de aproximadamente 7.

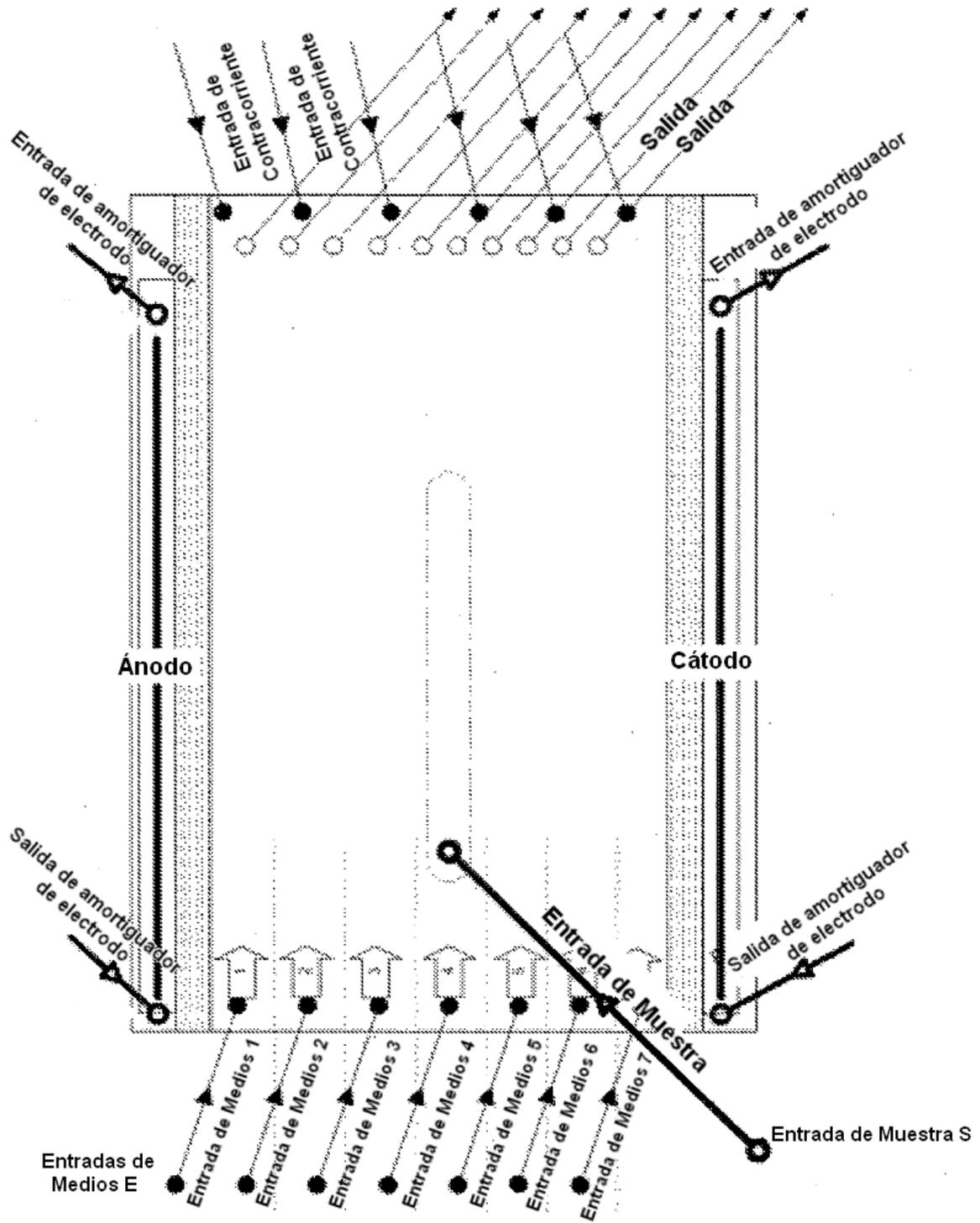


FIG. 1

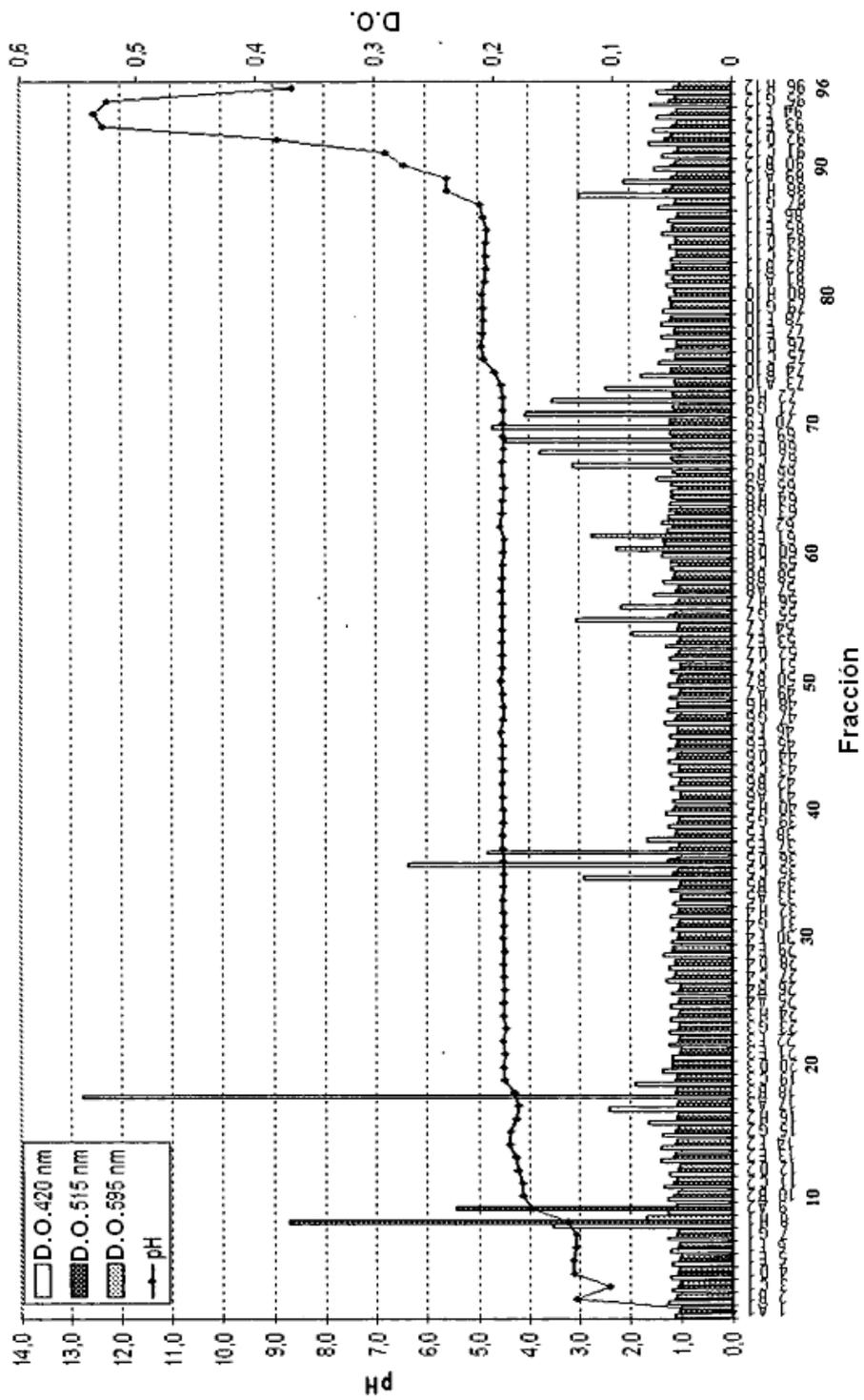


FIG. 2A

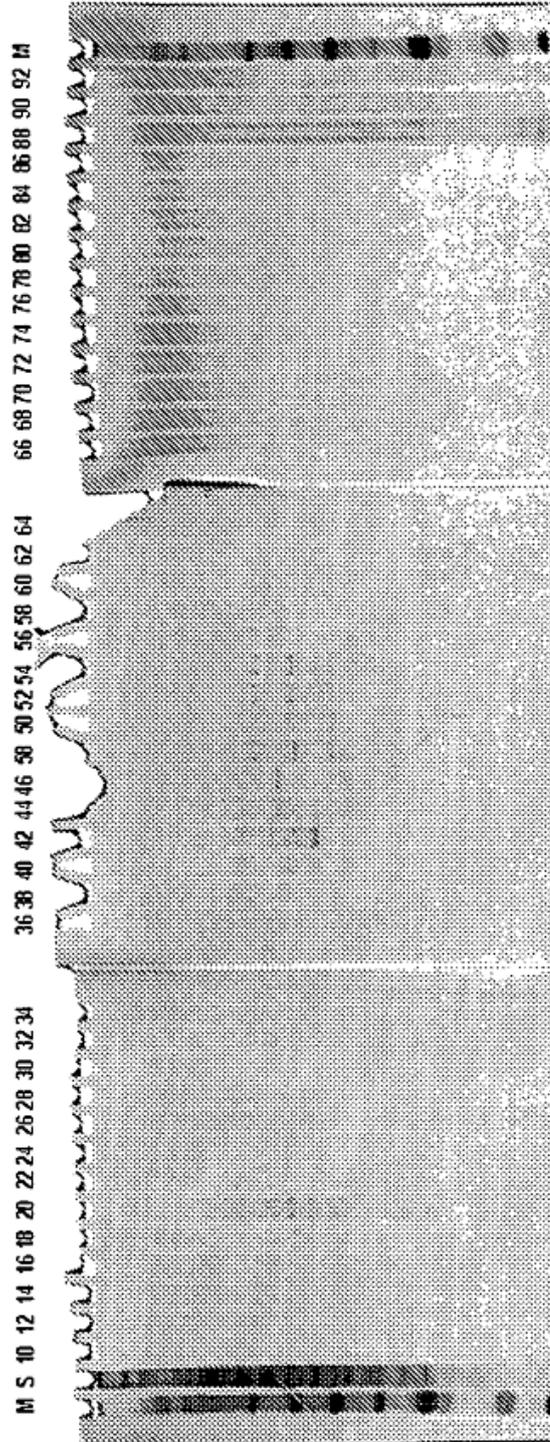


FIG. 2B

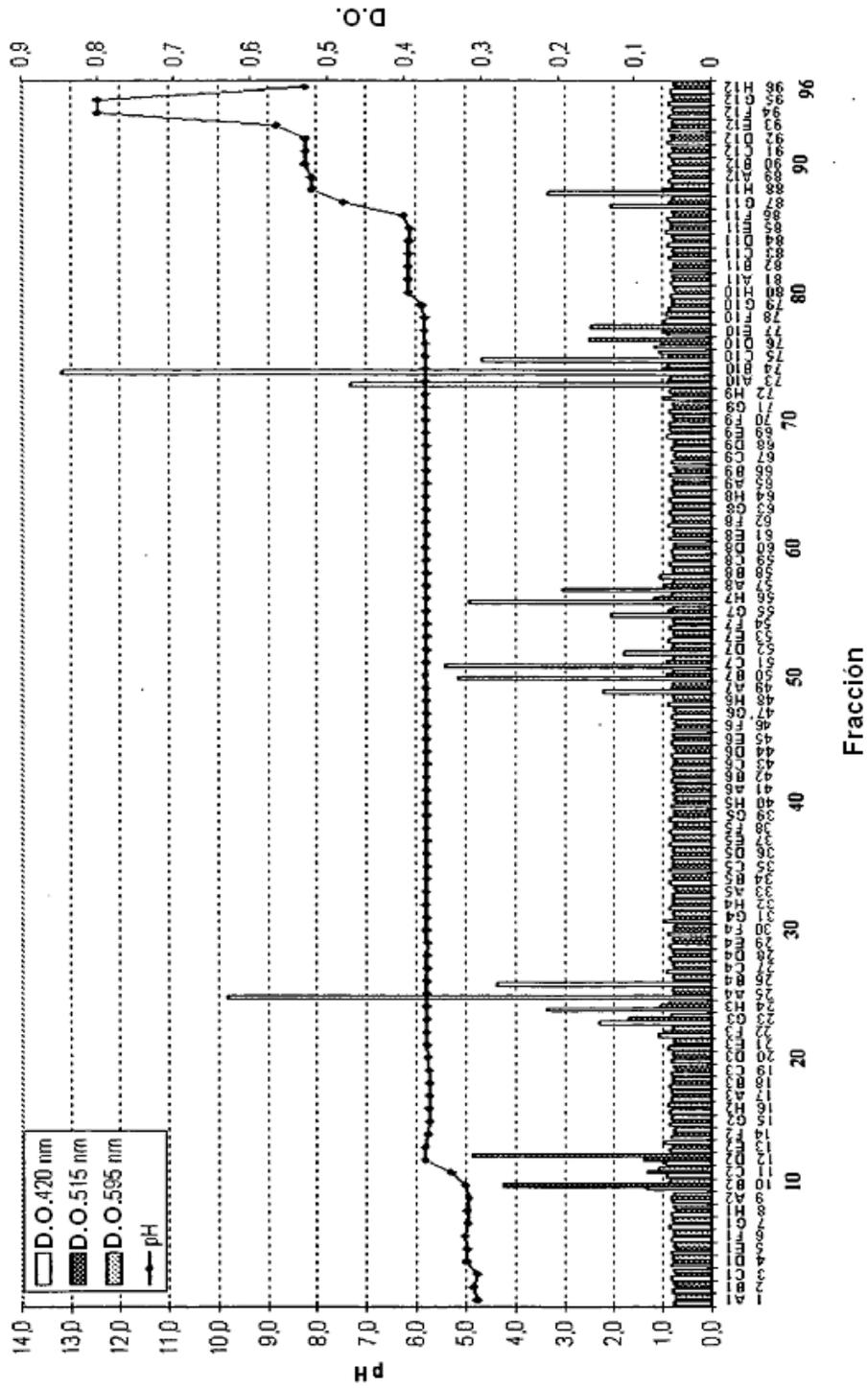


FIG. 3A

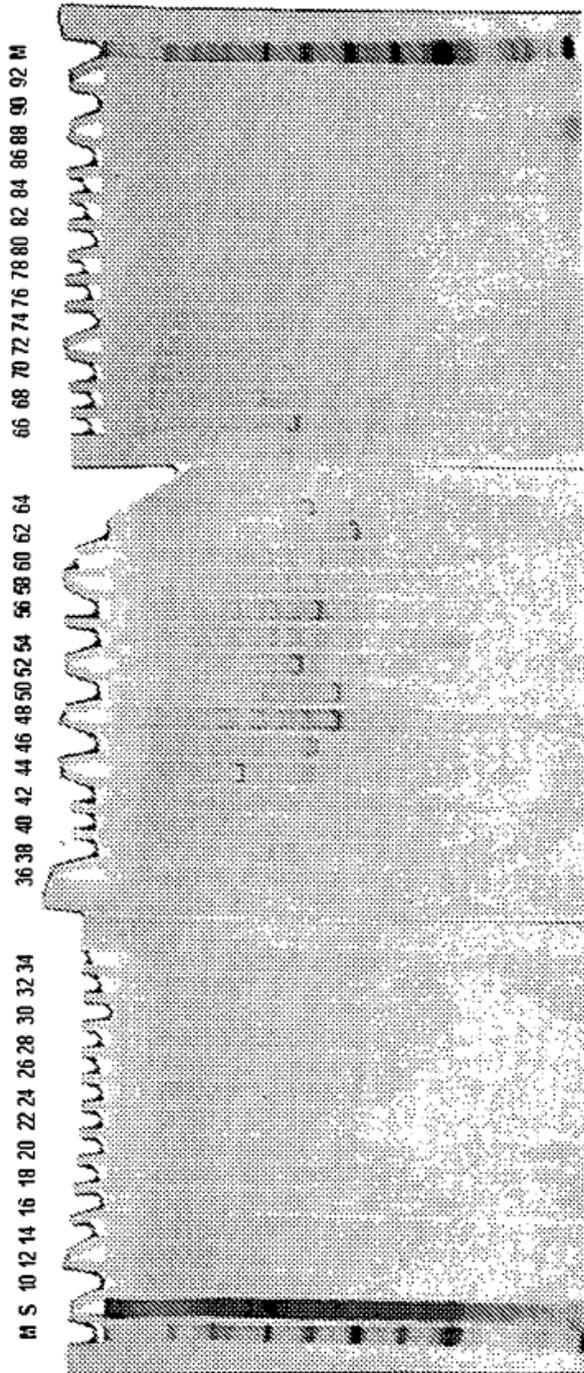


FIG. 3B

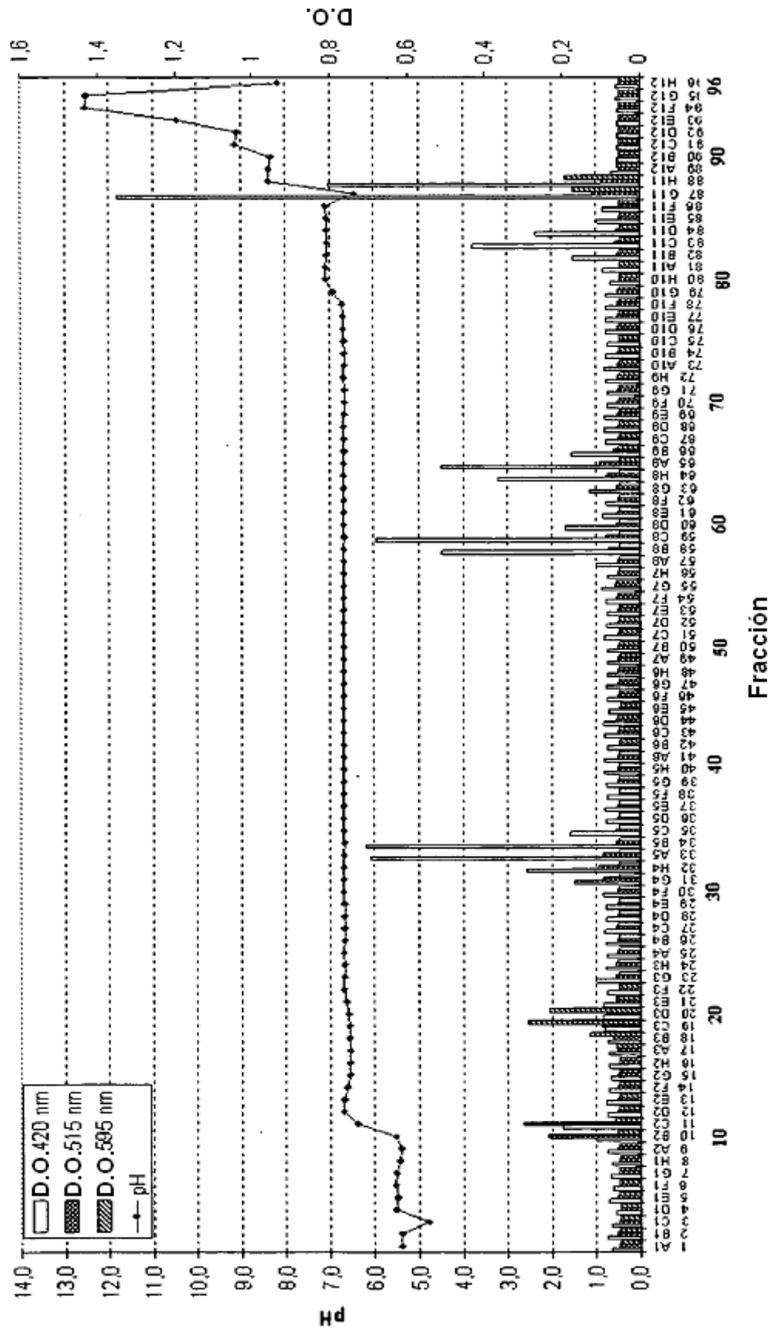


FIG. 4A

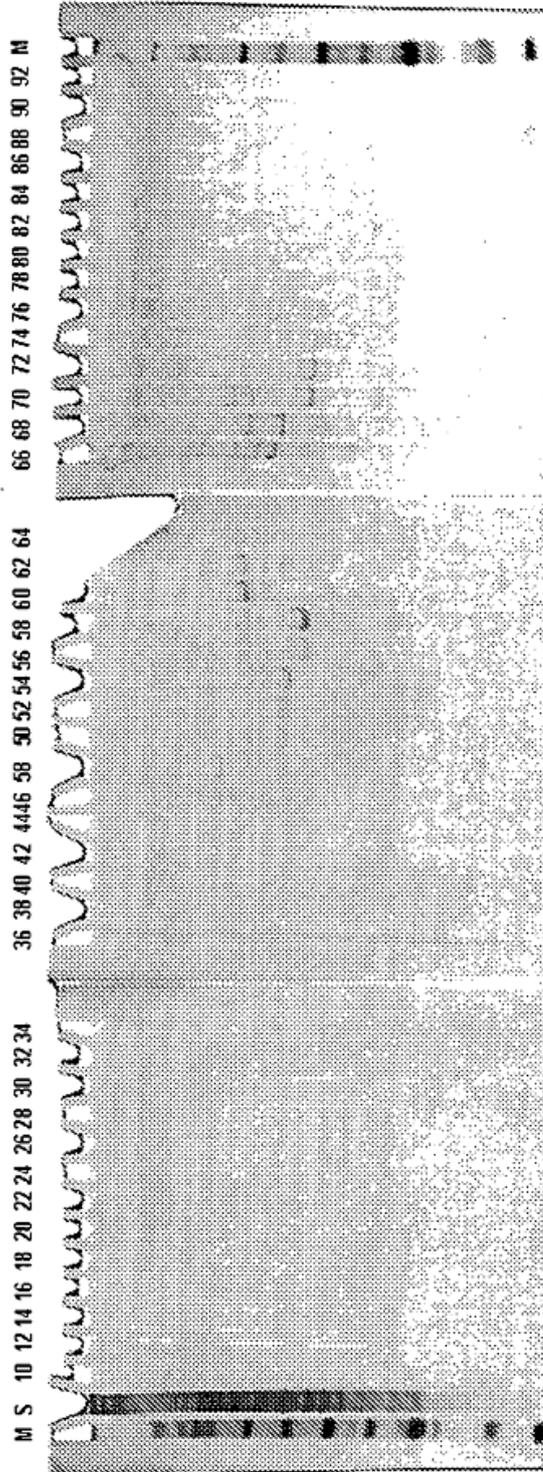


FIG. 4B

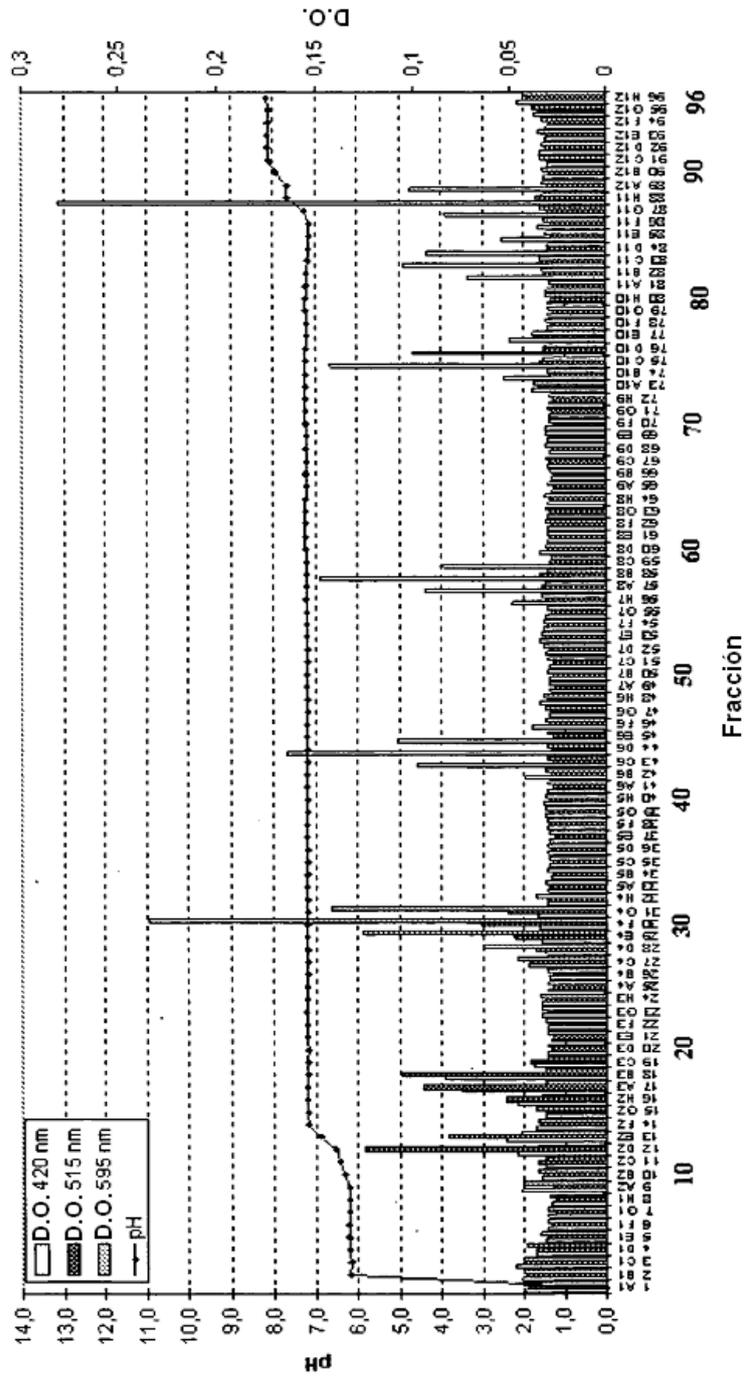


FIG. 5

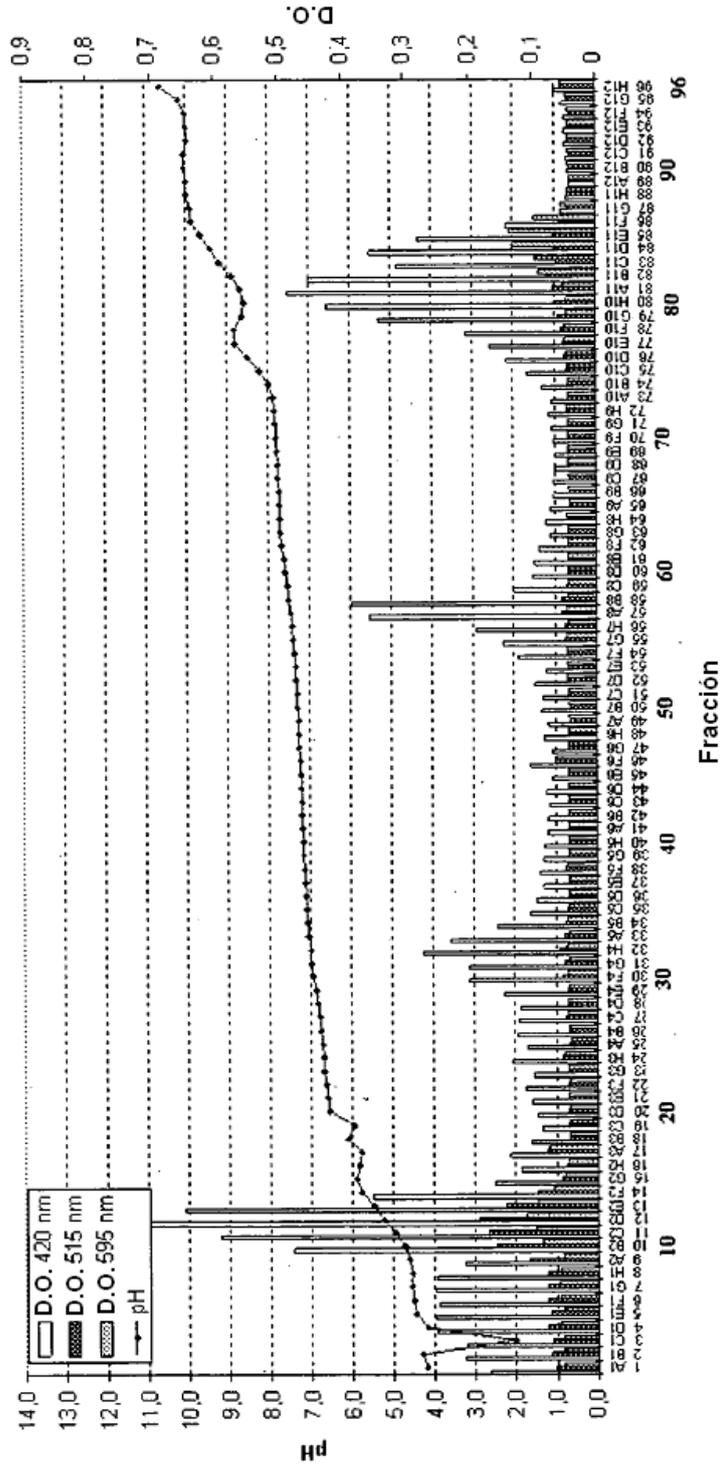


FIG. 6

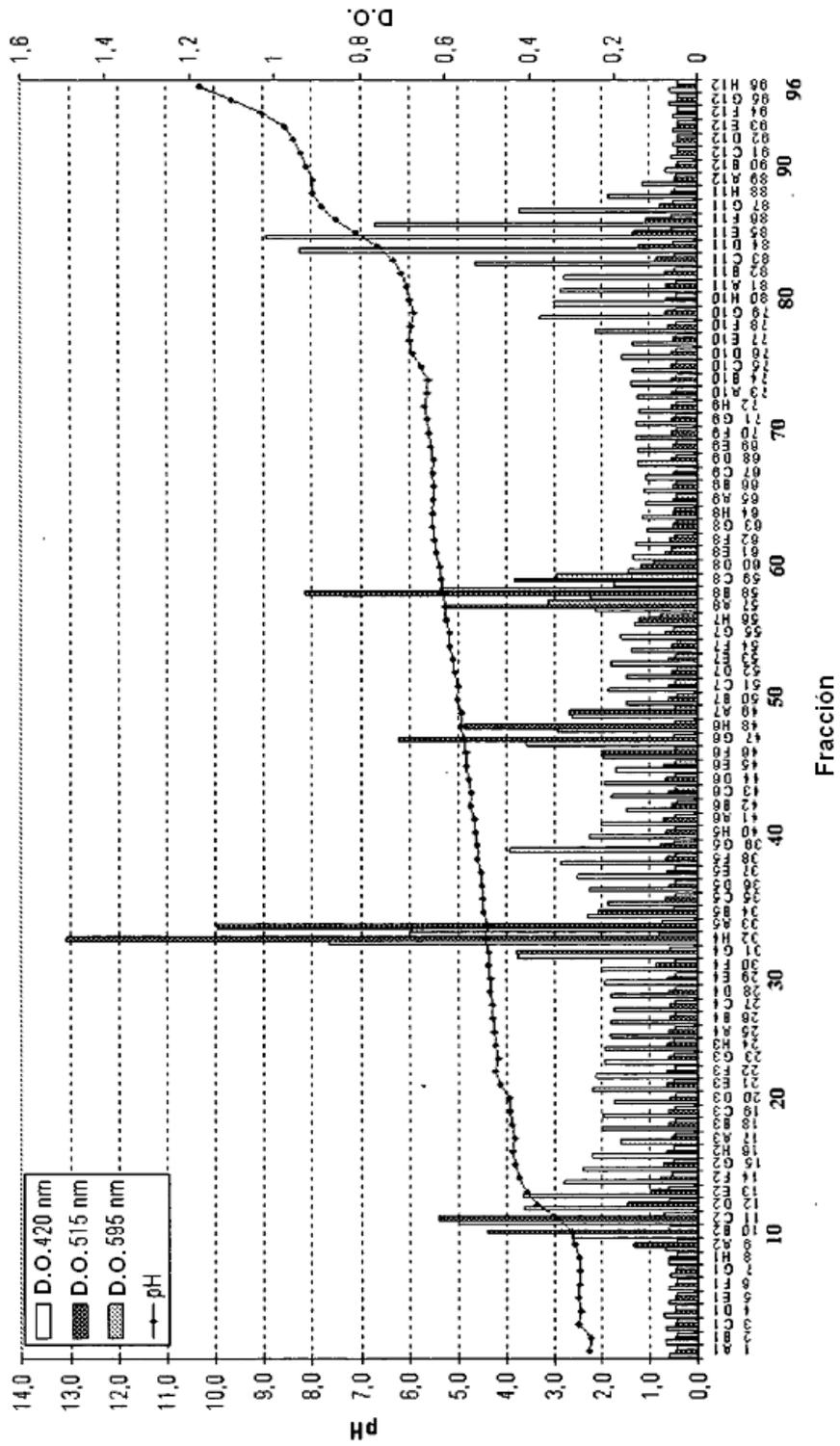


FIG. 7

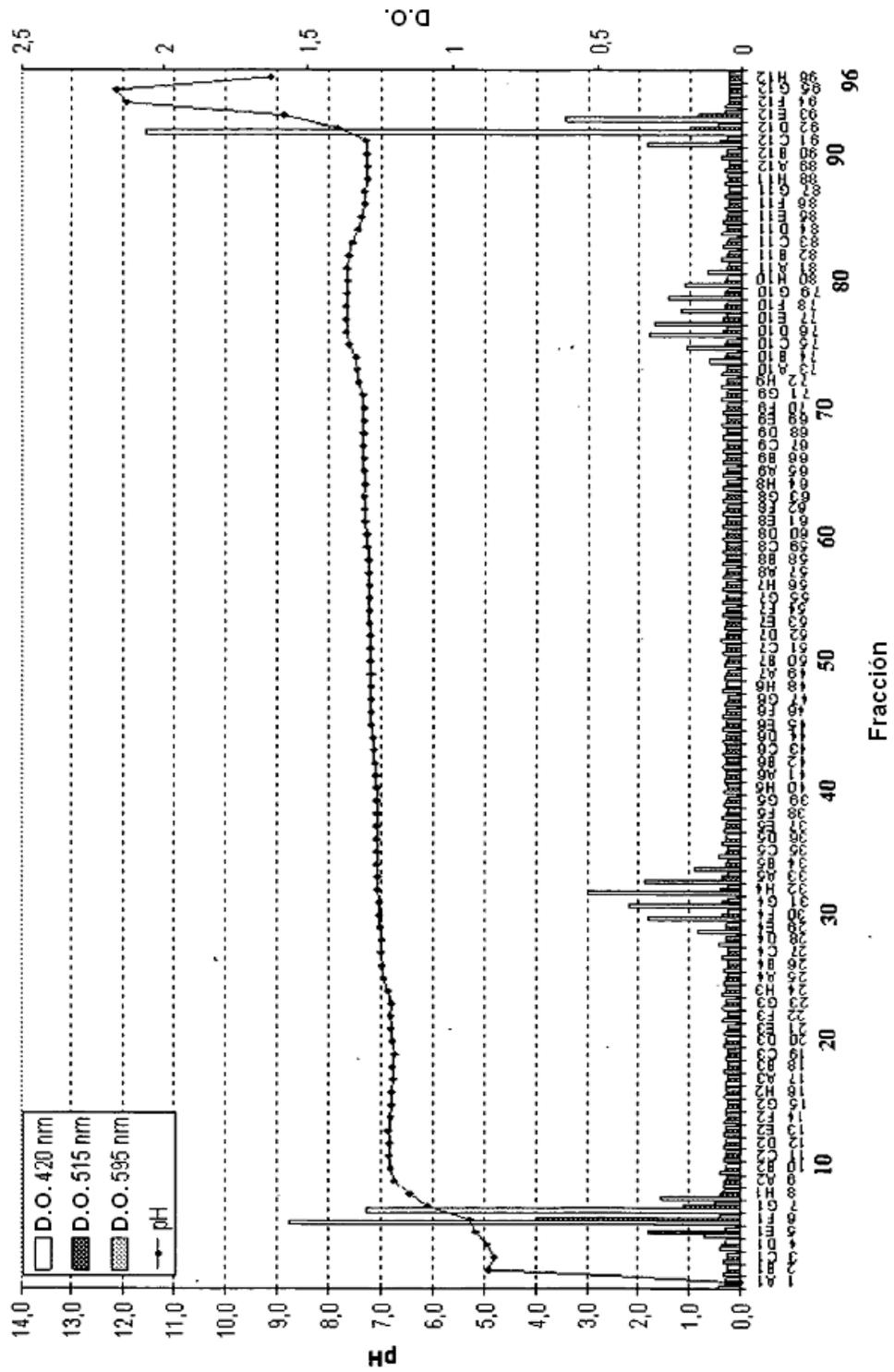


FIG. 8

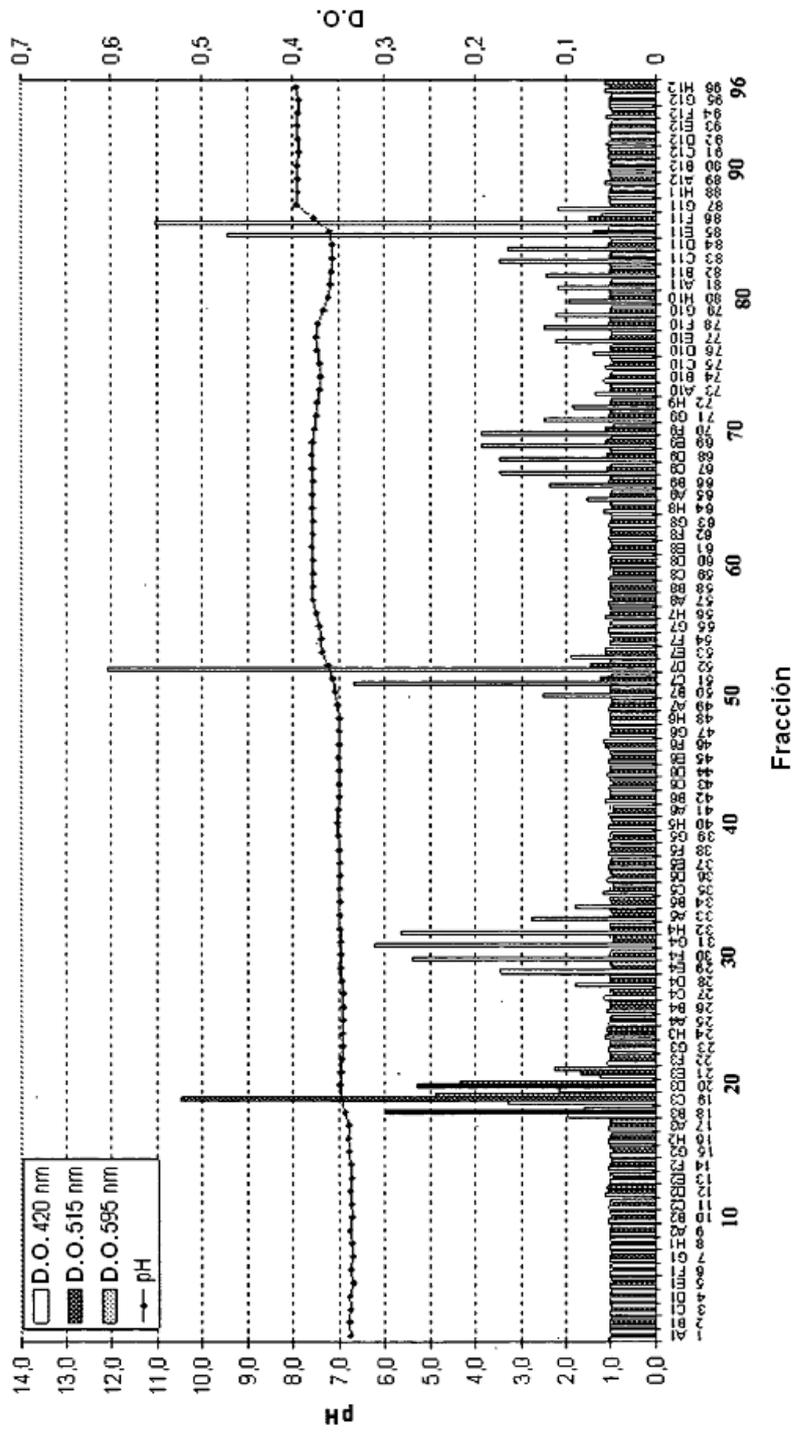


FIG. 9

Procedimiento de FFE en Modo de Intervalo Cíclico

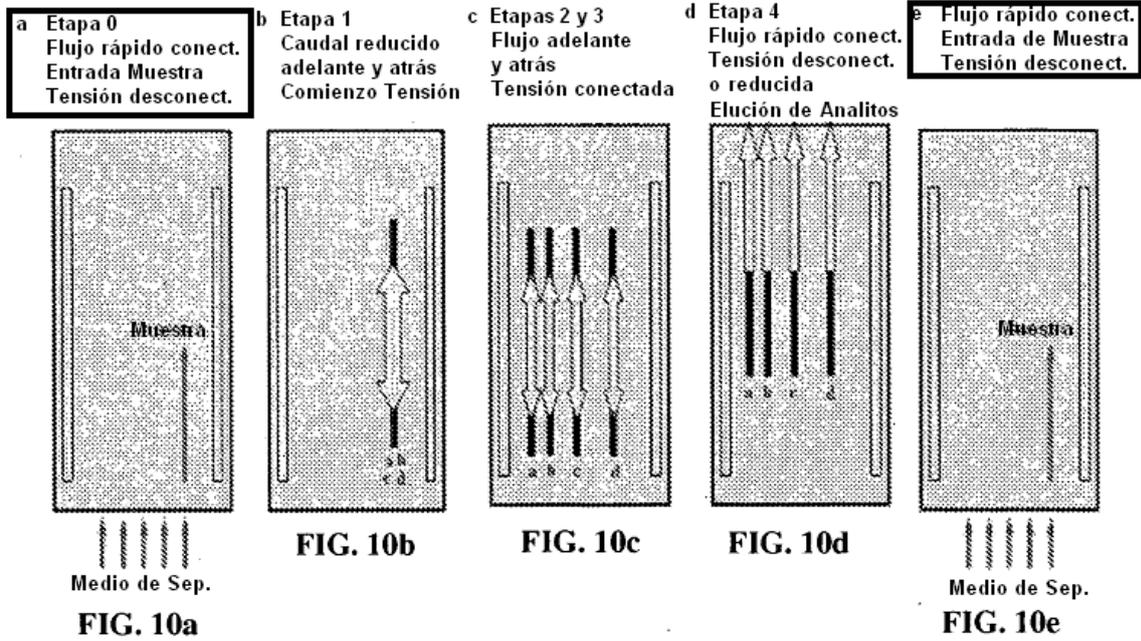


FIG.10

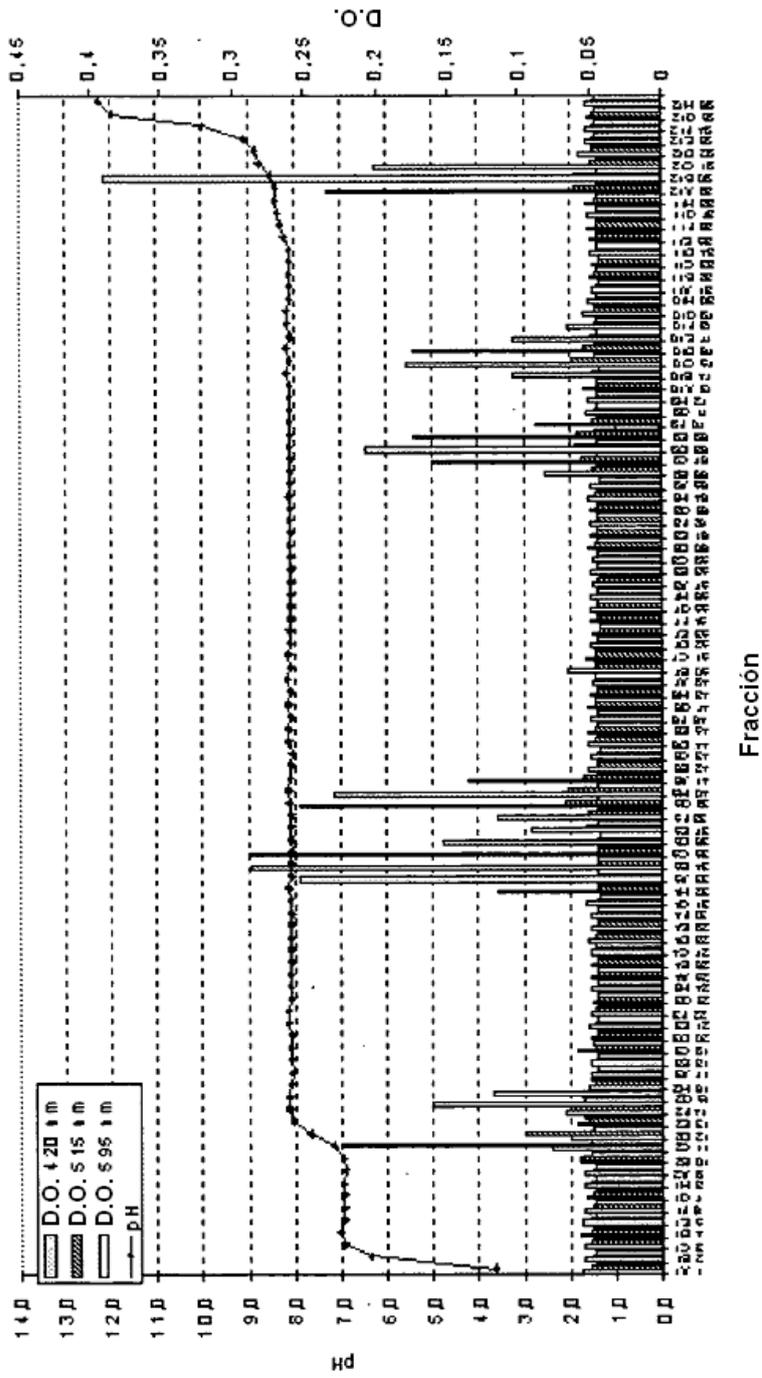


FIG. 11A

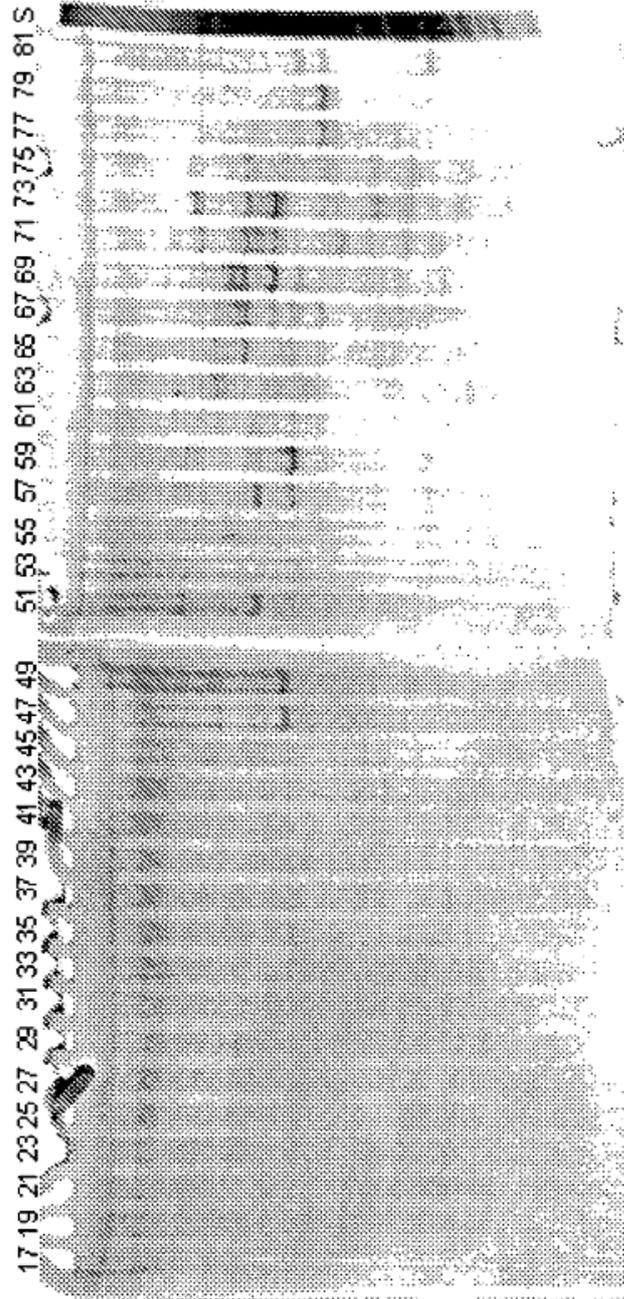


FIG. 11B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5275706 A [0009] [0077] [0230]
- US 6328868 B [0010] [0077] [0220] [0230]
- WO 0250524 A [0011]
- US 5447612 A, Bier [0013]
- US 2004050697 A [0015] [0077] [0230]
- US 2004050698 A [0015] [0016] [0077] [0230]
- WO 03060504 A [0015]
- WO 03060503 A [0032]
- US 2004045826 A [0077] [0230]
- US 2004026251 A [0077] [0230]
- WO 2008053047 A [0077] [0174] [0222] [0230]
- WO 200802806 A [0077]
- US 3705845 A [0169]
- WO 2008025806 A [0174] [0222] [0230]
- WO 2006119001 A [0228]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- Analytical Biochemistry. Addison Wesley Longman Limited, 1998 [0003] [0004]
- KRIVANOVA L. ; BOCEK P. Continuous free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, vol. 19, 1064-1074 [0007]
- BONDY B. ; BAUER J. ; SEUFFERT I. ; WEBER G. Sodium chloride in separation medium enhances cell compatibility of free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 1995, vol. 16, 92-97 [0008]
- HANSEN E. ; HANNIG K. Antigen-specific electrophoretic cell separation (ASECS): Isolation of human T and B lymphocyte subpopulations by free-flow electrophoresis after reaction with antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1982, vol. 11 (51), 197-208 [0008]
- K. HANNIG ; K. H. HEIDRICH. *Free-flow Electrophoresis*, ISBN 3-921956-88-9 [0012]
- WEBER et al. *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, 325-328 [0016]